

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie der
Freien Universität Berlin

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 β -HSD) aus Humanplacentamikrosomen

Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und
Charakterisierung zweier 17 β -HSD-Aktivitäten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wilfried Runge
aus Delmenhorst

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0039

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie der
Freien Universität Berlin

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 β -HSD) aus Humanplacentamikrosomen

Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und
Charakterisierung zweier 17 β -HSD-Aktivitäten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wilfried Runge
aus Delmenhorst

Referent: Professor Dr. Dr. Ernst Schütte

Korreferent: Professor Dr. M. Wenzel



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

promoviert am : 17.8.1976

Ich danke Herrn Dr. med. Kunhard Pollow für die Überlassung
des Dissertationsthemas und für die hilfreiche Unterstützung
bei der Anfertigung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte, o. Prof., danke ich für
großzügige Unterstützung und wertvolle Hinweise.

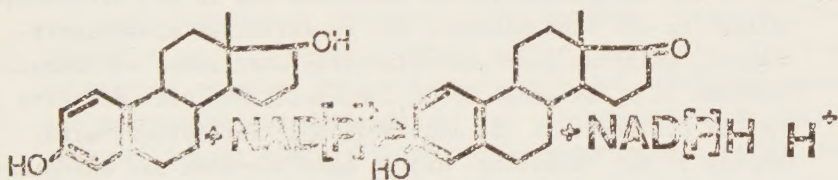
Inhalt

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methodik	8
2. 1.	Trivialnamen und Abkürzungen	8
2. 2.	Steroide	8
2. 3.	Substanzen	8
2. 4.	Gewebepräparation	9
2. 5.	Extraktion der Phospholipoide aus der Mikrosomenfraktion	9
2. 6.	Phospholipase A-Behandlung	10
2. 7.	Phospholipase D-Behandlung	10
2. 8.	Reaktivierung der Phospholipase-behandelten Mikrosomenfraktion	10
2. 9.	Fraktionierung nativer und Phospholipase- behandelter Mikrosomen	11
2. 9.1.	Zonalzentrifugation	11
2. 9.2.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation	11
2. 9.3.	Gelchromatographie	12
2. 9.4.	DEAE-Chromatographie	12
2. 9.5.	Isoelektrofokussierung	12
2. 9.6.	Gelelektrophorese	13
2.10.	Enzymaktivitätsbestimmungen	13
2.10.1.	17 β -HSD-Aktivitätsbestimmung	13
2.10.2.	"Transhydrogenase-Aktivitätsbestimmung"	13
2.10.3.	Identifizierungsmaßnahmen	14
2.11.	Phospholipoidbestimmung	15
2.11.1.	Gesamtphospholipoidbestimmung	15
2.11.2.	Bestimmung der einzelnen Phosphatide	15
2.12.	Proteinbestimmung	16
2.13.	Elektronenmikroskopie	17
2.14.	Molekulargewichtsbestimmung	17
3.	Ergebnisse	18
3. 1.	Phospholipoid-Extraktion der Mikrosomen- fraktion mit organischen Lösungsmitteln	18
3. 1.1.	Elektronenmikroskopie	18
3. 1.2.	Gelisoelektrofokussierung "nativer" und extrahierter Mikrosomen	20

3.1.3.	Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von Phospholipoidgehalt und Reaktivierung der extrahierten Mikrosomen	21
3.2.	Einfluß von Phospholipase A und D auf den Phospholipoidgehalt in Humanplacenta-Mikrosomen	24
3.2.1.	Inaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD durch Phospholipase A und D	25
3.2.2.	Reaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD nach Inaktivierung durch Phospholipase A bzw. D	27
3.2.3.	Phospholipoid- und 17 β -HSD-Aktivitätsverteilung in nativen und Phospholipase A bzw. D behandelten Mikrosomen nach Zonalzentrifugation	29
3.2.4.	Reinigung der mikrosomalen 17 β -HSD	30
3.2.5.	Molekulargewicht	35
3.3.	Kinetische Eigenschaften der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen 17 β -HSD	36
3.3.1.	Proteinmenge und Zeit	36
3.3.2.	pH-Optimum	38
3.3.3.	Temperaturoptimum	38
3.3.4.	Bestimmung der Michaeliskonstanten	40
3.3.5.	Substrat- und Coenzym-Spezifität	41
3.4.	Wasserstofftransfer zwischen C ₁₇ von E ₂ und C ₁₇ von Androstendion	42
4.	Diskussion	45
4.1.	Einfluß der Phospholipoide in Humanplacenta-Mikrosomen auf die Aktivität der 17 β -HSD	45
4.2.	Mechanismus der Aktivierung mikrosomaler Enzymaktivitäten durch Phospholipoide	46
4.3.	Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und Charakterisierung der mikrosomal gebundenen 17 β -HSD	46
4.4.	Vergleich einiger Eigenschaften der mikrosomalen 17 β -HSD mit der cytoplasmatischen 17 β -HSD	48
4.5.	Zellphysiologische Bedeutung zweier membran-gebundener mikrosomaler 17 β -HSD-Aktivitäten	50
5.	Zusammenfassung	52
6.	Literatur	55
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Einführung empfindlicher Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Steroiden in biologischem Material hat in den letzten Jahren eine Fülle neuer Befunde zutage gefördert, die zum überwiegenden Teil eine Aufschlüsselung der reduktiven und oxydativen Veränderungen im Zwischenstoffwechsel von Sexualhormonen zulassen. Zum Beispiel ist erkannt worden, daß unter den Reaktionen, denen Östradiol-17 β im Zwischenstoffwechsel unterliegt, zwei als die wichtigsten allen übrigen Veränderungen am Molekül voranstellen: Einführung einer Sauerstofffunktion an C-16 durch sogenannte Hydroxylasen und die Oxydation an C-17(1-8). Beide Reaktionen führen von der biologisch aktiven Verbindung zum ausscheidungsfertigen Endprodukt (nach Sulfatierung oder Kopplung an Glucuronsäure). Als Schlüsselenzym der Transformation von Östradiol-17 β zu Östron fungiert die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase(17 β -HSD). Sie katalysiert reversibel im Steroidkörper von Sexualhormonen an C-17 den Reaktionsschritt Hydroxy- $\rightarrow$ Oxo-Gruppe, wie in folgendem Reaktionsschema für Östradiol-17 β als Substrat dargestellt:



Die 17 β -HSD kommt ubiquitär in Mikroorganismen(9-11) und höher organisierten Lebewesen(12-17) vor. Während die bakteriellen Enzyme ausschließlich NAD als Wasserstoffüberträger benötigen, können die tierischen Enzyme mit NAD und/oder NADP reagieren.

Untersuchungen zahlreicher Autoren(18-21) an verschiedenen Organen des Menschen haben gezeigt, daß nicht nur in Sexualhormon-produzierendem Gewebe(Placenta, Ovarien, Hoden), son-

dern auch in deren Zielorganen mit Sexualhormonwirkung (Mamma, Myometrium, Endometrium) und in Sexualhormon-unspezifischen Organen (Leber, Niere, Ileum, Erythrocyten) 17 β -HSD-Aktivitäten nachweisbar sind.

Breitangelegte Untersuchungen über die subzelluläre Verteilung der 17 β -HSD in der Humanplacenta (1,2,8,19,20) haben gezeigt, daß die 17 β -HSD als lösliche Enzymaktivität in der Cytoplasmafraktion zu finden ist, strukturgebunden im endoplasmatischen Retikulum vorkommt und mit der Außenmembran der Mitochondrien assoziiert ist. Die hochaktive lösliche 17 β -HSD, die von mehreren Arbeitsgruppen hochangereichert und charakterisiert wurde (22-28), katalysiert Östradiol-17 β -spezifisch den Reaktionsschritt C₁₇-Hydroxy nach C₁₇-Oxo, was zu der Bezeichnung Östradiol-"sensitives"-17 β -Enzym geführt hat. Dagegen sind die strukturgebundenen 17 β -HSD-Aktivitäten nicht an eine spezifische Konformation des Steroidkörpers gebunden, sie katalysieren reversibel die Reaktion C₁₇-Hydroxygruppe $\rightleftharpoons$ C₁₇-Oxogruppe mit gleicher Reaktionsgeschwindigkeit von Ring-A-phenolischen Östrogenen wie von C₁₉-Steroiden (z.B. Testosteron). Diese von Lehmann und Breuer (29) und von Pollow et al. (28) gemachte Feststellung verbunden mit der Beobachtung, daß in den endoplasmatischen Membranen und in der Mitochondrienfraktion der Humanplacenta ein spezifischer Wasserstofftransfer zwischen stoffwechselaktiven Positionen von Sexualhormonen (z.B. zwischen der C₁₇-Position von Östradiol-17 β und der C₁₇-Position von Androstendion) katalysiert wird, führten zu der Vermutung, daß im Membransystem des endoplasmatischen Retikulums zwei substratunterschiedlich arbeitende 17 β -HSD-Aktivitäten vorhanden sind: eine Östradiol-"sensitive"-17 β -HSD und eine Testosteron-"sensitive"-17 β -HSD. Der spezifische Wasserstofftransfer zwischen den Steroidhormonen unterschiedlicher biologischer Aktivität wäre erklärbar durch die räumlich enge Verflechtung beider 17 β -HSD-Aktivitäten in einer definierten Mikrosomenpopulation verbunden mit einer zielgerichteten Wanderung der durch die Sexualhormone spezifische reduzierten Pyridinnukleotide als obligate wasserstoffübertragende Coenzyme innerhalb dieses

Zellkompartiments.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, Argumente für die Stichhaltigkeit dieser Vermutung zu finden. Das besondere Augenmerk liegt auf der Solubilisierung, Anreicherung und Separierung der in der Mikrosomenfraktion fixierten 17 β -HSD-Aktivitäten. Verschiedene Techniken der Solubilisierung mikrosomaler Enzyme sind bekannt: Autolyse(31), mechanische Zerkleinerung durch Ultraschall(32), pH-Wechsel der Puffersysteme(33), Detergenzien-Behandlung(47) und Trypsin-Hydrolyse(34). Im folgenden wird die Solubilisierung der 17 β -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen durch Extraktion der Phospholipide mit Aceton/Butanol oder wäßrigem Aceton und durch Phospholipase-A bzw. D-Behandlung erreicht und die Separierung durch Isoelektrofokussierung der durch Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie angereicherten 17 β -HSD.

Da in der Regel die Ablösung von membrangebundenen Enzymaktivitäten aus der Mikrosomenmembran zu einem partiellen Enzymaktivitätsverlust führt, da Phospholipide nicht nur Strukturelemente sind, sondern auch einen aktivierenden Einfluß auf membrangebundene Enzymaktivitäten ausüben, - wie von Staudinger et al.(30) gezeigt werden konnte - wird über die Wechselwirkung zwischen Phospholipidgehalt der Mikrosomenmembran und Mikrosomensubfraktionen und der 17 β -HSD-Aktivität berichtet. Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit den enzymkinetischen Parametern der gereinigten und separierten 17 β -HSD-Aktivitäten. Außerdem wird der Versuch unternommen, die Frage nach der biologischen Bedeutung zweier streng substratspezifisch arbeitender 17 β -HSD-Aktivitäten(E_2 - bzw. Testosteron-"sensitiv") zu beantworten.

2. Material und Methodik

2.1. Trivialnamen und Abkürzungen

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase: 17 β -HSD, Östradiol-17 β : E₂, Östron: E₁, 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on: Testosteron, 4-Androsten-3,17-dion: Androstendion.

Medium I: 0,25 Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, pH 7,4, 3 mM Magnesiumacetat, 20proz. Glycerin(v/v)

Medium II: 0,2 M Kaliumphosphat, 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, 3 mM Magnesiumacetat, pH 7,4, 20proz. Glycerin(v/v)

2.2. Steroide

(4-¹⁴C)-E₂ (spez. Aktiv. 58 mCi/mMol), (17-³H)-E₂ (spez. Aktiv. 3 Ci/mMol), (4-¹⁴C)-E₁ (spez. Aktiv. 58 mCi/mMol), (4-¹⁴C)-Testosteron (spez. Aktiv. 58,2 mCi/mMol), (4-¹⁴C)-Androstendion (spez. Aktiv. 60 mCi/mMol) und (4-¹⁴C)-Progesteron (spez. Aktiv. 60 mCi/mMol) waren Handelspräparate (Radiochemical Centre, Amersham, England). Die Steroide wurden dünn-schichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln auf Reinheit geprüft.

2.3. Substanzen

Cytochrom c, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Aldolase, Katalase, Phospholipase A aus *Crotalus terr.* (200 U/mg), Phospholipase D aus Weißkohl (0,5 U/mg), NAD⁺, NADP⁺: Biochemica Boehringer, Mannheim.

Sphingomyelin, Lecithin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin: Applied Science Laboratories, Inc., State College, Pennsylvania, USA.

Ampholin pH 3,5-10: LKB Producter AB, Stockholm, Schweden.
BioGel A-0,5m (200-400 mesh): Bio Rad Lab., Richmond, Calif.

DEAE-Sephadex A-50: Pharmacia fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.

Lichtgrün SF, Phenazin Methosulfat, Acrylamid, N,N-Methylen-bis-acrylamid: Serva, Heidelberg.

Jodacetamid, Phenyltetrazoliumchlorid: Schuchardt, München.
p-Chlormercuribenzoat: C. Roth, Karlsruhe.

Alle übrigen Substanzen und organischen Lösungsmittel waren von p.a. Reinheitsgrad (Merck, Darmstadt).

2.4. Gewebepräparation

Die normal ausgestoßenen Humanplacenten (Frauenklinik Charlottenburg der FU Berlin, Dir. Prof. Dr. H. Lax) wurden unter Eiskühlung zum Labor transportiert, von fetalen Membranen, Nabelschnur und bindegewebigen Septen befreit und mit der Schere zerkleinert. Das zerschnittene Material wurde mit 0,25 M Saccharoselösung (1:1, g/v) versetzt, für 3x10 sec im Ultra Turrax (220 V) zerkleinert und anschließend im Glashomogenisator (Fa. Braun-Melsungen) bei 1000 U/min durch 5maligen Vor- und Rücklauf homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Gaze filtriert und bei 20 000 x g für 30 min (Servall Ultrazentrifuge RC-2, Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für 60 min bei 105 000 x g (Spinco Ultrazentrifuge L2-65B, Rotor 30, Fa. Beckmann) zentrifugiert. Das Sediment (Mikrosomenfraktion) wurde zweimal mit 0,25 M Saccharoselösung gewaschen (native Mikrosomen).

2.5. Extraktion der Phospholipide aus der Mikrosomenfraktion

Die Extraktion der Phospholipide mit Aceton/Wasser 9:1 (v/v) bzw. Butanol erfolgte nach der von Lester und Fleischer (35) angegebenen und von Schulze und Staudinger (30) modifizierten Methode bei 0°C und -25°C.

2.6. Phospholipase-A-Behandlung

In einem Gesamtvolumen von 30 ml wurden 222 mg gewaschenes Mikrosomenprotein mit 1,1 mg Phospholipase A und $2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ CaCl_2 , 0,01 M Tris/HCl (pH 8,0) bis zu 120 min bei 37°C inkubiert. Vor der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch im Glas-homogenisator suspendiert. Nach der Inkubation wurde die Phospholipase ~~A~~ durch Chelatisierung der Ca-Ionen mit $6,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$ EDTA inaktiviert.

2.7. Phospholipase-D-Behandlung

Für die Inkubation der Mikrosomenfraktion mit Phospholipase D wurden im Gesamtvolumen von 30 ml 222 mg Mikrosomenprotein mit 37 mg Phospholipase D und $2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ CaCl_2 , 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,6) suspendiert und bis zu 120 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phospholipase D erfolgte wie für Phospholipase A beschrieben.

2.8. Reaktivierung der Phospholipase-behandelten Mikrosomenfraktion

Die Phospholipide wurden in 0,15 M Phosphatpuffer (pH 7,4) durch Ultraschallung (25 kHz) für 1 min unter Eiskühlung suspendiert (Sonifer L 75, Bronson Instr. Inc., Dunbury, Conn., USA). Jeweils 22 mg Mikrosomenprotein wurden entweder mit Aceton bei 0°C extrahiert oder unter optimalen Pufferbedingungen für 30 min mit Phospholipase ~~A~~ bzw. Phospholipase D inkubiert, anschließend bei $158\,000 \times g$ sedimentiert und das zweimal gewaschene Sediment in 2 ml 0,15 M Phosphatpuffer (pH 7,4), $6,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$ EDTA im Glashomogenisator homogenisiert. Die Homogenate wurden mit Phospholipoid-Suspension auf 5 ml verdünnt und für 30 min zur Reaktivierung bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die 17 β -HSD-Aktivität bestimmt.

2.9. Fraktionierung nativer und Phospholipase-behandelter Mikrosomen

2.9.1. Zonalzentrifugation

In den mit 3000 U/min laufenden Zonal-Rotor Ti 14 (Fa. Beckman) wurde über die obere Fülleinheit eine lineare Saccharose-Dichte-Gradiente (13proz. bis 55proz., g/v) mit der Beckman-Gradienten-Pumpe (Modell 141) gepumpt (Pumpgeschwindigkeit 1 l/h). An diesen Gradienten schloß sich nach außen ein Polster aus 60proz. Saccharoselösung an, das die Sedimentation schwerer Partikel auf den Rotorboden verhindern sollte. Nach innen schloß sich an den Gradienten die Probe an: a) 222 mg natives Mikrosomenprotein in 30 ml 8,5proz. Saccharoselösung, b) je 222 mg Mikrosomenprotein wurden 30 min mit Phospholipase A bzw. D unter optimalen Pufferbedingungen inkubiert (siehe Abschnitt 2.6. und 2.7.), anschließend die Phospholipasen durch Zusatz von $6,6 \cdot 10^{-3}$ M EDTA inaktiviert und das Inkubationsgemisch bei $158\,000 \times g$ für 60 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml 8,5proz. Saccharoselösung aufgenommen.

Der Probe folgten 40 ml "Overlay" aus 1proz. Saccharoselösung. Nach der Zentrifugation (12 h, 30 000 U/min, 5°C, Spinco-Ultrazentrifuge Modell L2-65B) wurde der Rotor bei 3000 U/min mit destilliertem Wasser (Core B 29) von innen nach außen ausgespült und das gesamte Rotorvolumen mit dem LKB Fraktionssammler UltraRac gesammelt.

Der Dichtegradient wurde über den Brechungsindex (n_{20}^D) der einzelnen Fraktionen mit dem Abbe-Refraktometer (Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.) bestimmt.

2.9.2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation

Die Fraktionen 60-75 (Abb. 11, durch Zonallauf separierte Phospholipase-A-behandelte Mikrosomenfraktion) wurden gegen Medium I dialysiert und einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

2.9.3. Gelchromatographie

Das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat (35proz. bis 50proz. Sättigung) wurde in 3 ml Medium I gelöst und auf eine mit Medium I äquilibrierte BioGel A-0,5m Chromatographie-Säule (90 cm x 1,5 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit dem äquilibrierenden Puffer, die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 20 ml/h. Die Eluate wurden in Fraktionen von etwa 1,5 ml in einem LKB UltraRac Fraktionssammler aufgefangen.

2.9.4. DEAE-Chromatographie

Die nach Gelfiltration gewonnenen enzymaktiven Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingeengt, auf eine mit Medium I äquilibrierte DEAE-Sephadex-Säule (30 cm x 1,5 cm) aufgetragen und mit 50 ml des äquilibrierenden Puffers in den Ionenaustauscher eingewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Puffer-Gradienten, der durch das Mischen zweier konstanter Volumina (100 ml) von Medium I und II hergestellt wurde.

2.9.5. Isoelektrofokussierung

Die nach Ionenaustauschchromatographie erhaltenen enzymaktiven Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingeengt und nach der Vorschrift von Vesterberg und Svensson (36) in einer 110 ml Säule (Fa. LKB Producter AB, Stockholm, Schweden) bei 4°C in einem automatisch hergestellten Saccharose-Dichte-Gradienten, dem 20% Glycerin (v/v) zugesetzt wurde, isoelektrofokussiert. Zur Ausbildung der pH-Gradienten wurden Trägerampholyte (Standardampholin (40%) der Fa. LKB) für den pH-Bereich 3,5-10 verwendet. Anodenpuffer: o-Phosphorsäure, Kathodenpuffer: Äthylendiamin. Nach Abfall der Stromstärke auf einen konstanten Wert wurde für 36 h bei 800 V isoelektrofokussiert. 3-ml-Fraktionen wurden gesammelt und der pH-Wert, die 17β-HSD-Aktivität und der Proteingehalt bestimmt.

2.9.6. Gelelektrophorese

Zur Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid der nativen, der Butanol/Aceton-, der Aceton-extrahierten Mikrosomen und der partiell gereinigten 17 β -HSD wurden die Methoden von Wrigley (37) und Rodbard und Chramback (38) modifiziert. Durchführung: Fokussierung bei 20°C für 3 h bei 1,0 mA/Gel, 0,5 ml Enzymlösung wurde auf den Gelzylinder (Durchmesser 8 mm) aufgetragen (5% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 20% (v/v) Glycerin, 1% Ampholin (pH 3,5-10), Photopolymerisation mit Riboflavin (4 mg/100 ml). Als Anodenlösung diente 0,02% o-Phosphorsäure, als Kathodenlösung 0,02% Äthanolamin. Zur Darstellung der 17 β -HSD-Aktivität wurden die Gele bei 37°C für 2 h in der Dunkelheit in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung inkubiert: 5 ml H₂O, 2 ml 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,4, 0,5 ml NAD (5 mg/ml), 0,25 ml Phenazin Methosulfat (0,25 mg/ml), 1,5 ml Nitroblautetrazolium (1,7 mg/ml) und 0,4 ml Steroid (2,7 mg/ml Äthanol). Die Eiweißfärbung wurde durchgeführt mit 0,1proz. Lichtgrünlösung (0,5 N Essigsäure/Methanol 100/30 (v/v) für 1 h. Gewaschen wurde bis zur Entfärbung des Untergrundes mit 0,5 N Essigsäure/Methanol, 100/30 (v/v) und anschließend konserviert mit Waschlösung, der 1% Glycerin zugesetzt war.

2.10. Enzymaktivitätsbestimmungen

2.10.1. 17 β -HSD-Aktivitätsbestimmung

Die 17 β -HSD-Aktivität wurde bestimmt durch Messung der Oxydation von E₂ bzw. Testosteron (jeweils 0,1 μ Ci ¹⁴C-markiertes Steroid unter Zusatz von 10 μ M "kaltem" authentischen Steroid gelöst in 0,1 ml Propylenglycol) in 0,15 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37°C unter Luftzutritt, 0,1 mg Coenzym pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml.

2.10.2. "Transhydrogenase-Aktivitätsbestimmung"

Messung des Wasserstofftransfers von C₁₇ von E₂ nach C₁₇

von Androstendion unter Bildung von Testosteron mit Hilfe von in 17-Position ^3H -markiertem E_2 . Typischer Inkubationsansatz: 1,5 μCi ($17\text{-}^3\text{H}$)- E_2 unter Zusatz von 10 μM "kaltem" E_2 in Gegenwart von 50 μM nicht radioaktiv markiertem Androstendion werden in 0,15 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37°C unter Luftzutritt, 0,1 mg Coenzym pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml inkubiert. Indikator für den Wasserstofftransfer ist der isolierte durch $\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ -markierte Androstendionmetabolit. Die Inkubationen wurden durch Einbringen der Reaktionsgefäße in Eiswasser beendet. Durch dreimaliges Ausschütteln der Inkubationsmedien mit jeweils 5 ml Äther/Chloroform 3:1 wurden die Steroidmetaboliten extrahiert, über Stickstoff zur Trockene eingengt und in 0,1 ml Äthanol aufgenommen. Die in Äthanol aufgenommenen Extraktionsrückstände wurden auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Als Trägermaterial wurde Kieselgel F₂₅₄ (Schichtdicke 0,25 mm) der Fa. Woelm, Eschwege, verwendet in Form von Glas-Fertigplatten (20 cm x 20 cm). Die Chromatographie erfolgte aufsteigend in geschlossenen Systemen mit den Laufmitteln Cyclohexan/Essigester 1:1, Benzol/Methanol 19:1 und Chloroform/Aceton 17:3. Die Laufzeit betrug 45 min. Die quantitative Bestimmung der einzelnen radioaktiv markierten Steroide erfolgte durch direkte Messung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte mit Hilfe des Dünnschichtscanners II der Fa. Berthold, Wildbad, unter Verwendung eines fensterlosen Methan-Durchflußzählers mit 2 π -Zählgeometrie (Zählausbeute für ^{14}C 18%, für ^3H 1,2%) und gleichzeitiger Integration der einzelnen Substanzgipfel mit dem Berthold-Integrationsschreiber. Die Zählausbeute wurde durch Mitlaufen eines radioaktiven Standards für jede Platte einzeln bestimmt.

2.10.3. Identifizierungsmaßnahmen

Die Identifizierung der radioaktiven Substanzgipfel erfolgte durch Mitlaufen authentischer Referenzsubstanzen, die durch auffallendes UV-Licht bzw. durch Anfärben mit 70%iger äthanolischer Schwefelsäure sichtbar gemacht wurden, und durch

mikrochemische Methoden a) Oxydation mit Chromtriooxid/Eisessig, b) Reduktion mit Natriumhydrid, c) Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Benzol, d) Umkristallisieren der radioaktiven Metabolite mit authentischer Substanz aus drei verschiedenen Lösungsmitteln (Äthanol, Benzol, Cyclohexan/Essigester 1:1 bis zur konstanten spezifischen Aktivität).

2.11. Phospholipoidbestimmung

2.11.1. Gesamtpospholipoidbestimmung

Die 105 000 x g Sedimente wurden nach Folch et al.(39) mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert und die Extrakte mit CaCl_2 -Lösung gewaschen. Zur Bestimmung des Phosphorgehaltes wurde die Methode von Bartlett(40) modifiziert: aliquote Teile des Extraktes wurden eingedampft, mit 300 μl 10,5 N HClO_4 versetzt, 60 min bei 185°C im schräg stehenden Reagenzglas (Kühlrückfluß) verascht, mit 1,0 ml NaOH versetzt, für 10 min auf 100°C erhitzt, um Meta- bzw. Poly- in Orthophosphat zu überführen(41), mit 100 μl 3proz. Ascorbinsäurelösung versetzt (nach beiden Zugabeschritten gut gemischt), 7 min lang auf 100°C erhitzt und bei 820 nm gemessen. Für 10 nÄquiv. Phosphor ergibt diese Methode eine Extinktionsdifferenz von 0,200 Extinktionseinheiten gegenüber dem Reagenzienleerwert.

2.11.2. Bestimmung der einzelnen Phosphatide

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Phosphatide wurden mit "Kieselgel 60 HR reinst nach Stahl"(Fa. Merck) etwa 3/8 mm stark beschichtete Platten benutzt. Für 16 20x10-cm-Platten wurden etwa 40 g Gel in 80 ml 1 mM Na_2CO_3 -Lösung im Ultra Turrax bis zur Dünnflüssigkeit suspendiert. Ohne derartige Vorbehandlung haftet das Gel ohne Bindemittel nicht fest genug auf der Platte. Nach Aktivierung der Platten(30 min bei 100°C) wurde aufsteigend im geschlossenen System in Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 25:15:4:2 (v/v) (42) etwa 45 min lang entwickelt. Die Substanzflecken wurden mit Joddampf sichtbar gemacht, abgekratzt und in die Phosphatbestimmungs-

gläser überführt. Das hier verwendete Kieselgel bietet den Vorteil, daß die Gelbeimengung zum Ansatz in ausreichendem Maße unabhängig von der Größe des Substanzfleckes eine jeweils gleiche Erhöhung des Reagenzienleerwertes von nur etwa 0,015 Extinktionseinheiten hervorruft, womit die Notwendigkeit der quantitativen Berücksichtigung des Gels(40) oder einer Elution(41) entfällt. Vor dem Messen muß zentrifugiert werden. Die Wiederfindungsquote betrug unter Berücksichtigung des an der Auftragskapillare bzw. bei Extrakteinengung in dem betreffenden Gefäß verbleibenden Phosphorrestes(beides wurde jeweils bestimmt) in der Regel über 95%. Die Umrechnung von der durch den jeweiligen Fleck auf der DC-Platte hervorgerufenen Extinktion auf nÄquiv. Phosphor/mg Protein geschah nach folgendem Rechenschema:

$$\frac{\Delta E_{FL}}{(\Delta E_{ST}/\mu g P) \times 31} \times \frac{V_{Ges.ex.} \times (\Sigma \Delta E_{PL} \times \Delta E_R)}{Prot. \times R \times V_{e.Ex.} \times \Sigma \Delta E_{PL}} \times 1000 = \begin{matrix} \text{spez. Geh.} \\ (\text{nÄquiv.P./} \\ \text{mg Prot.}) \end{matrix}$$

Dabei ist: ΔE_{FL} = Extinktion des betreffenden Substanzfleckes, 31 = Atomgewicht des Phosphors, $\Delta E_{ST}/\mu g P$ = von 1 mg Phosphor enthaltendem Standard hervorgerufene Extinktion, $V_{Ges.ex.}$ = Volumen des nach der $CaCl_2$ -Wäsche gewonnenen Extraktes, $\Sigma \Delta E_{PL}$ = Extinktion aller Substanzflecken der Platte, E_R = Extinktion des Phosphors von Auftragskapillare und Einengungsgefäß, Prot. = Menge des im Volumen der zur Lipidextraktion eingesetzten Mikrosomensuspension vorhandenen Proteins in mg, R = Wiederfindungsrate in %, $V_{e.Ex.}$ = Volumen des auf die Platte gebrachten Extraktes.

Bei der Aufstellung dieses Rechenschemas wurde davon ausgegangen, daß sich der als ΔE_R bestimmte Phosphor und nicht wiedergefundene Anteile des Gesamtphosphors auf die Einzelphosphatide verteilen wie der auf der Platte gefundene Phosphor.

2.12. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteine erfolgte nach der Methode von

Lowry et al.(43), als Eichprotein diente Rinderserumalbumin.

2.13. Elektronenmikroskopie

Das Material wurde mit Glutaraldehyd nach der Methode von Karnovsky(44) fixiert. Die Kontrastierung erfolgte in gepufferter Osmiumtetroxidlösung. Es wurde Natriumkakodylat-Puffer, pH 7,3 verwendet. Anschließend wurde das Material in einer aufsteigenden Alkoholreihe(50%,60%,80%,90%,100%) entwässert und in E.R.L. 4206(aliphatisches Epoxid) nach der Methode von Spurr(45) eingebettet. Mit einem LKB-Mikrotom wurden Ultra-dünnschnitte angefertigt und mit Uranylcitrat in Bleicitratlösung nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop, Siemens Elmiskop I A, ausgeführt.

2.14. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der aus der Mikrosomenfraktion separierten und angereicherten 17 β -HSD-Aktivität wurde mit Hilfe von Eichproteinen durch Gelfiltration an BioGel A-0,5m vorgenommen(Chromatographiesäule 90 cm x 1,5 cm). Die Elutionsvolumina zeigten gut reproduzierbare Werte(Enzymaktivitäten und Eichproteine).

3. Ergebnisse

3.1. Phospholipoid-Extraktion der Mikrosomenfraktion mit organischen Lösungsmitteln

Die in Tab.1 zusammengefaßten Befunde, die sich an Extraktionsversuche mit Rattenlebermikrosomen von Schulze und Stausinger(10) anlehnen, zeigen, daß aus der Mikrosomenfraktion mit Hilfe organischer Lösungsmittel die Phospholipide fraktioniert extrahierbar sind. Die Extraktion ist mit einem Verlust an Protein verbunden, das im Waschwasser nachweisbar ist, aber keine 17 β -HSD- bzw. "Transhydrogenase"-Aktivität aufweist.

	r. Mol P/ mg Protein	Protein mg/0,1 ml	n Mol P mg Protein			
			Sphingo- myelin	Lecithin	Phosphati- dylinosit + Phosphati- dylserin	Phosphati- dylathanol- amin
Native Mikrosomen	560,4	1,43	149,6	185,5	71,4	153,9
0°C Aceton-extrahierte Mikrosomen	192,5	0,89	94,2	31,2	32,8	34,3
0°C Aceton-extrahierte Mikrosomen	131,0	0,62	67,9	21,1	19,8	22,2
Aceton-Butanol-extrahierte Mikrosomen	59,4	0,53	11,9	14,3	19,4	13,8

Tab.1 Phospholipoidgehalt nativer und mit organischen Lösungsmitteln extrahierter Mikrosomen aus der Humanplacenta. Mittelwerte aus drei Bestimmungen. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

3.1.1. Elektronenmikroskopie

Um die Einwirkung der Extraktionsvorgänge auf die mikrosomalen Membranstrukturen zu untersuchen, wurden vergleichende elektronenmikroskopische Aufnahmen der intakten Mikrosomenfraktion und der extrahierten 105 000 x g Rückstände gemacht (Abb.1a-c). Die dreimal gewaschenen "nativen" Mikrosomen zeigen vesikuläre Strukturen in unterschiedlicher Größe mit teilweise gequollener Membran und Ribosomenbesatz. Die bei 0°C mit Aceton/Wasser extrahierten Mikrosomen fallen auf durch eine starke Quellung der Mikrosomen-Doppellamelle und durch eine mitunter vollständige Ausfüllung der vesikulären Räume mit einem dichten Material. Die Größe der Partikel ist weitgehend ein-

heitlich. Nach zusätzlicher Butanol-Extraktion der Aceton-extrahierten Mikrosomen-Partikel wird das Bild bestimmt durch eine Aufhebung der vesikulären Strukturen. Das Material zeigt amorphes Charakter. Die von Trump et al. (46) durchgeführte elektronenoptischen Studien von mit Phospholipase C behandelten Rattenlebermikrosomen zeigen in ähnlicher Weise Strukturauflösungen der mikrosomalen Membran durch Aufquellung und Bruch der Doppellamelle.

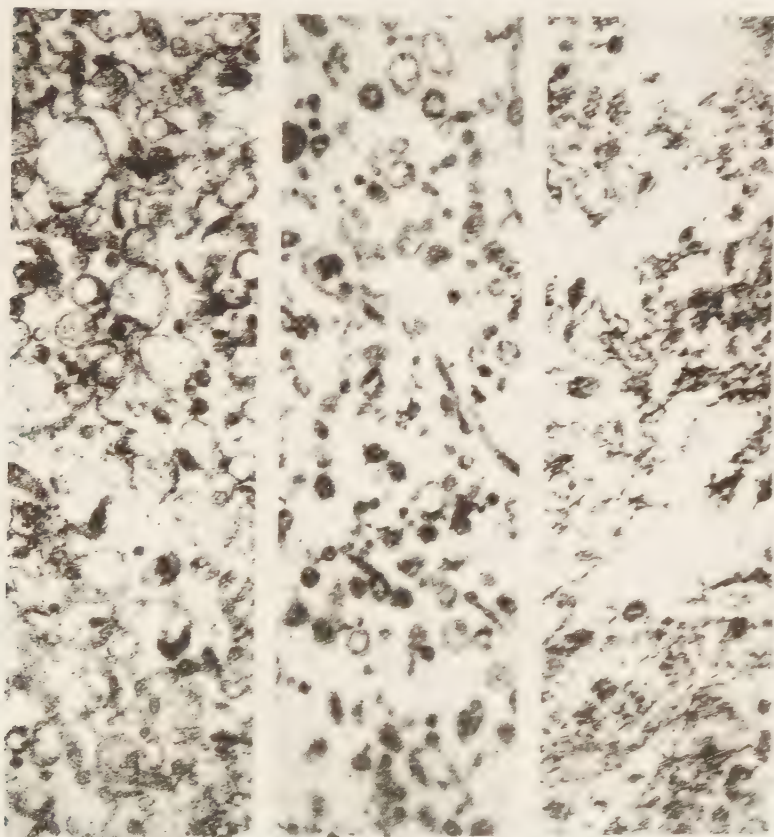


Abb.1 a) Dreimal mit 0,5% Saccharoselösung gewaschenes Mikrosomen
b) mit Aceton bei 0°C extrahierte Mikrosomen und 0,5% Saccharose
c) Butanol extrahierte Mikrosomen (Vergrößerung 41.000-fach)

1.1.1. Gelabsorptionsmessung "nativer" und extrahierter Mikrosomen

Die in Abb. 2 zusammengefaßten Densitogramme zeigen, daß sowohl "native" Mikrosomen als auch die nach Zerstörung der mikrosomalen Strukturelemente durch Extraktion der Mikrosomenfraktion mit Aceton-Wasser bzw. Aceton-Butanol gewonnenen Subfraktionen in Polyacrylamid-Gel unter Zusatz von 1% Trägerampholin (pH 3,5-10) aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte in Einzelfraktionen separierbar sind. Der beste Effekt zeigt sich nach Aceton-Extraktion bei 0°C. Es blieb unklar, ob die durch die einzelnen Gipfel repräsentierten Subfraktionen echte lösliche Proteine sind oder mikrosomale Bruchstücke, die durch den Extraktionsvorgang als Artefakte gebildet wurden.



Die in Abb. 2 dargestellten Densitogramme zeigen die nach isoelektrischer Fokussierung in Polyacrylamid-Gelmembranen aufgetrennten nativen Mikrosomen sowie der Subfraktionen, die nach Extraktion der Mikrosomenfraktion mit Aceton-Wasser bzw. Aceton-Butanol gewonnen wurden. Die pH-Wert-Messung wurde über die Länge des Gelstreifens in Einzelschichten durchgeführt. Die Densitogramme zeigen die relative Durchlässigkeit bei 578 nm.

3.1.3. Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von Phospholipidgehalt und Reaktivierung der extrahierten Mikrosomen

Aus Abb.3 geht hervor, daß die untersuchten mikrosomalen Enzymaktivitäten und der Phospholipidgehalt der Mikrosomen korreliert sind. Mit Abnahme des Gesamtpospholipidgehaltes ist eine Minderung der Enzymaktivitäten für die 17 β -HSD-Aktivität zu verzeichnen. Zusatz definierter Phosphatide zu der mit Aceton extrahierten Mikrosomenfraktion führt zu einer Wiedergewinnung der Enzymaktivitäten (Abb.4). Um einen maximalen Wert zu erreichen, müssen 4,5 μ Mol Phospholipoid pro ml Inkubationslösung zugesetzt werden. Steigerung der Phospholipoid-Konzentration darüber hinaus führt zu einem Aktivitätsverlust. Außerdem macht die Abb.4 deutlich, daß das Ausmaß der Reaktivierung der Enzymaktivitäten abhängig ist von der Natur des zugesetzten hochgereinigten Phospholipoids.

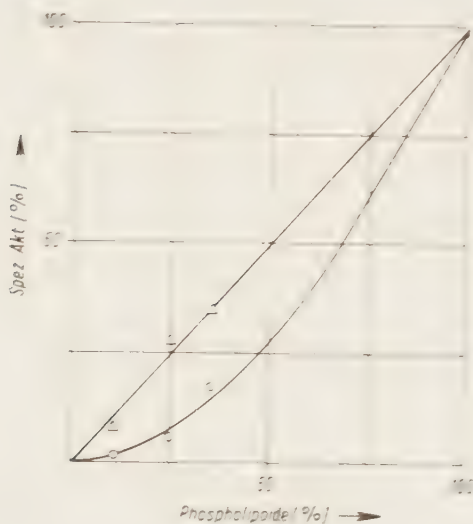


Abb.3 Einfluß der in der Mikrosomenmembran gebundenen Phospholipide auf die enzymatische Aktivität der 17 β -HSD (o) und die Transportaktivität (Δ). Ordinate: sez. Aktivität in % der nicht extrahierten Mikrosomen. Abszisse: Phospholipidgehalt der Mikrosomen in % des nicht extrahierten Mikrosomen.

So ist auffallend, daß nach Sphingomyelin- und Lecithin-Zusatz die spez. Aktivität der maximal reaktivierten 17 β -HSD weit höher liegt als in unbehandelten Mikrosomen. Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin zeigen keine Wirkung. Die "Transhydrogenase"-Aktivität zeigte eine partielle Reaktivierung durch

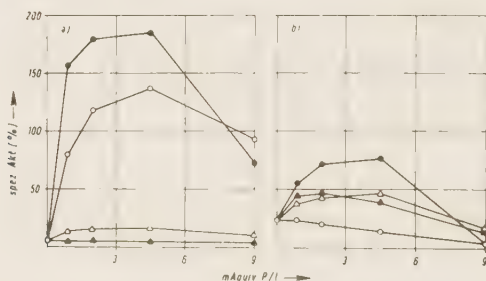


Abb.4 Rekombination der bei 0°C mit Aceton extrahierten Mikrosomenfraktion mit hochgereinigten Phospholipoiden zur Wiedergewinnung der enzymatischen Aktivität der 17 β -HSD (a) und der "Transhydrogenase"-Aktivität (b). Die Reaktivierung erfolgte im Inkubationsgefäß durch Zugabe von Sphingomyelin (●), Lecithin (○), Phosphatidyläthanolamin (▲) und Phosphatidylserin und anschließender 30minütiger Inkubation. Ordinate: spez. Aktivität in % der nicht extrahierten Mikrosomen. Abszisse: mMol der eingesetzten Phospholipide/l. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Phospholipoid-Zusatz, aber der Maximalwert erreichte nicht den Wert der spezifischen Aktivität der unbehandelten Mikrosomenfraktion. Lecithin war im Gegensatz zum 17 β -Enzym wirkungslos.

Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten nach dem Verfahren von Michaelis und Menten (Abb.5) zeigt, daß sowohl bei nativen Mikrosomen als auch bei extrahierten Mikrosomen die scheinbare Affinität zwischen Substrat und Enzym gleichbleibt und daß die Reaktions- und Maximalgeschwindigkeiten in der für eine nicht-kompetitive Hemmung typischen Weise verändert werden. Extrahierte Mikrosomen katalysieren die Wasserstoffübertragung zwischen E₂ und Androstendion und die Oxydation von E₂ zu E₁ bedeutend langsamer als die nativen Mikrosomen. Durch Rekombination extrahierter Mikrosomen mit definierten Phospholipoiden läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit des Originalzustandes wiedergewinnen und teilweise sogar eine Steigerung über den Maximalwert nativer

Mikrosomen erreichen. Dabei ist eine Abhängigkeit von der Art des zugesetzten Phospholipoids und der Phospholipoid-Konzentration zu beobachten.



Abb.5 a) Bildung von Östron aus E_2 durch die 17 β -HSD der unbehandelten und der bei 0°C mit Aceton extrahierten Mikrosomenfraktion der Humanplacenta in Abhängigkeit von E_2 -17 β und vom Zusatz hochgereinigter Phospholipide.

Linke Abb.: nicht-extrahierte Mikrosomen 1: ohne Phospholipide 2: mit Lecithin(3 mÄquiv. P/l) 3: mit Sphingomyelin(3 mÄquiv. P/l) 4: mit Phosphatidyläthanolamin(3 mÄquiv. P/l).

Rechte Abb.: bei 0°C mit Aceton extrahierte Mikrosomen A: ohne Phospholipide B: mit Lecithin(1 mÄquiv. P/l) C: mit Lecithin(3 mÄquiv. P/l) D: mit Sphingomyelin(1 mÄquiv. P/l) E: mit Sphingomyelin(3 mÄquiv. P/l) F: mit Phosphatidyläthanolamin(3 mÄquiv. P/l).

b) Bildung von (17- 3H)Testosteron durch Wasserstoffübertragung aus der 17-Position von (17- 3H)Östradiol auf Androstendion durch die "Transhydrogenase-Aktivität" der unbehandelten und der bei 0°C mit Aceton extrahierten Mikrosomen der Humanplacenta in Abhängigkeit von der Östradiol-Konzentration und vom Zusatz der Phospholipide. Diagramme nach Lineweaver und Burk. Gemessen wurde die Bildung 3H -markierten Testosterons.

Linke Abb.: nicht-extrahierte Mikrosomen 1: ohne Phospholipide 2: mit Lecithin(3 mÄquiv. P/l) 3: mit Sphingomyelin(3 mÄquiv. P/l) 4: mit Phosphatidyläthanolamin(3 mÄquiv. P/l)

Rechte Abb.: bei 0°C mit Aceton extrahierte Mikrosomen A: ohne Phospholipide B: mit Sphingomyelin(3 mÄquiv. P/l) C: mit Phosphatidyläthanolamin(3 mÄquiv. P/l) D: mit Lecithin(3 mÄquiv. P/l)

3.2. Einfluß von Phospholipase A und D auf den Phospholipidgehalt in Humanplacenta-Mikrosomen

Die in Tab.2 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß durch Phospholipase-Hydrolyse der Gehalt an Phospholipoiden, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums fixiert sind, in unterschiedlichem Ausmaß - bezogen auf die Einzelphosphatide - abnimmt; so werden bei pH 8,0 (37°C) durch Phospholipase A innerhalb von 60 min 74% des Lecithins abgebaut.

	Zeitdauer [min]	Gesamt- Protein [µg/0,1ml]	Gesamt- Phospho- lipoid	Sphingo- myelin [n Ä q u i v. P/ mg P r o t e i n]	Lecithin	Phosphati- dylinositol + Phosphati- dylserin	Phosphati- dylcholanol- amin
Native Mikrosomen	-	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9
Mit Phospholipase A- Behandlung	30	0,02	469,0	138,7	121,3	68,2	140,6
	60	0,78	330,9	111,3	48,8	49,1	121,7
Mit Phospholipase D- Behandlung	30	1,21	434,9	126,1	103,9	61,8	143,5
	60	1,03	298,6	98,7	33,7	37,5	128,7

Tab.2 Phospholipidgehalt nativer und mit Phospholipasen A und D behandelte Mikrosomen aus der Humanplacenta. Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

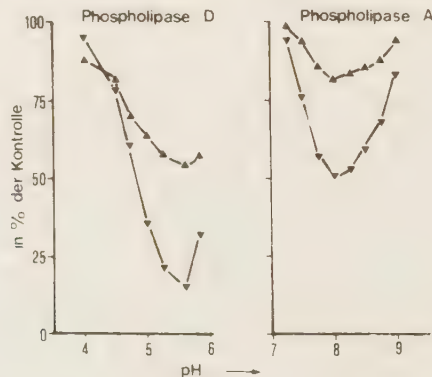


Abb.6 pH-Abhängigkeit der Inaktivierung der 17β-HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A bzw. D. Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg Phospholipase A (0,01 M Tris/HCl-Puffer) bzw. 3,7 mg Phospholipase D (0,1 M Acetat-Puffer) in 3 ml, 37°C, Inkubationsdauer 30 min. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

▲ $E_2 \rightarrow E_1$, 17β-HSD ▼ Testosteron → Androstendion, 17β-HSD

Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (=100%)

Phospholipase D spaltet bei pH 5,6 und 37°C in 60 min 82% des Lecithins. Die Phospholipase-Hydrolyse ist mit einem Verlust an Protein verbunden, das im Waschwasser des 158 000 x g Sediments Phospholipase-behandelter Mikrosomen nachweisbar ist.

Da keine proteolytischen Fremdaktivitäten in den Phospholipasepräparationen feststellbar waren, ist der Proteinverlust auf die Zerstörung der Mikrosomenlamelle durch die Hydrolyse der Phospholipoide, die an der Stabilisierung der komplexen Struktur beteiligt sind, zurückzuführen.

Wie für micellar verteiltes Phospholipoid liegt das pH-Optimum der Hydrolyse durch Phospholipase D zwischen 5,2 und 5,8; für Phospholipase A zwischen 7,6 und 8,4 (Abb. 6). Das Maß für die Phospholipase-Aktivität war die Aktivitätsabnahme der mikrosomalen 17 β -HSD-Aktivität, die - wie die Extraktionsstudien mit organischen Lösungsmitteln gezeigt haben - in linearer Beziehung korreliert ist mit dem Phospholipoidgehalt der Mikrosomenfraktion.

3.2.1. Inaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD durch Phospholipase A und Phospholipase D

Die 17 β -HSD wird durch Phospholipase A bzw. D mit einer Kinetik erster Ordnung inaktiviert (Abb. 7). Nach 30 min Phospholipase-A-Behandlung wird eine Restaktivität für die 17 β -HSD mit E₂ als Substrat von 61%, für Testosteron von 13% gemessen (Coenzym NAD). Phospholipase-D-Behandlung ergab nach 30 min für E₂ als Substrat und NAD als Coenzym 71% Restaktivität, wurde Testosteron als Substrat eingesetzt, lag der Wert bei 27%. Eine vollständige Inaktivierung wurde unter Phospholipase-A-Behandlung nach 120 min erreicht, wenn Testosteron als Substrat der 17 β -HSD eingesetzt wurde.

Bei einem Verhältnis von Mikrosomenprotein (in mg) zu Phospholipase-Aktivität (in Units) von 5:1 (Phospholipase A) bzw. 100:1

(Phospholipase D) werden die Geschwindigkeiten der Phospholipase-Hydrolyse bzw. der Inaktivierung der 17 β -HSD so weit herabgesetzt, daß die Kinetik der Inaktivierung als Reaktion nullter Ordnung sich darstellt (Abb.8). Bei Verwendung höherer Phospholipase-Aktivitäten fällt die Aktivität der 17 β -HSD sprunghaft in bezug auf die Ausgangsaktivität ab.

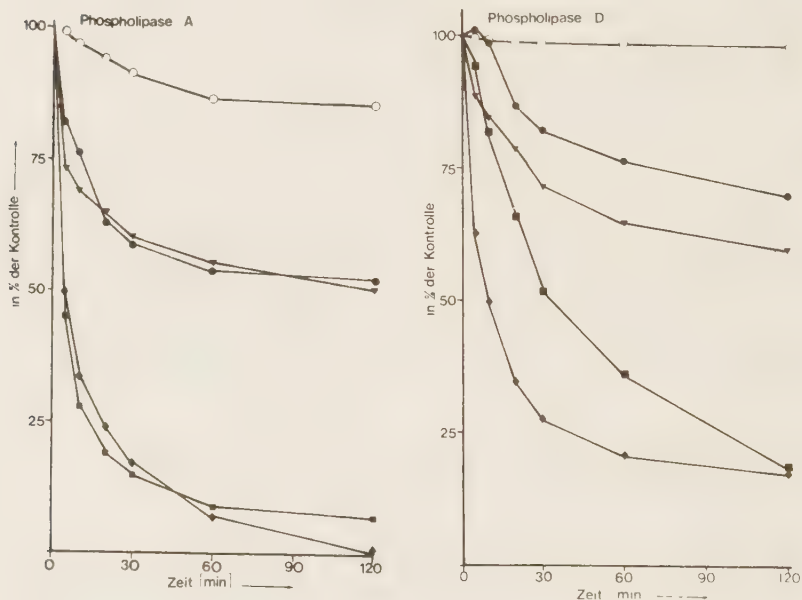


Abb.7 Zeitliche Abhängigkeit der Inaktivierung der 17 β -HSD-Aktivitäten der Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A (pH 8,0) und Phospholipase D (pH 5,6). Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg Phospholipase A bzw. 3,7 mg Phospholipase D in 3 ml, 37°C. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

- NADP
- ▼ NAD $E_2 \rightarrow E_1$, 17 β -HSD
- NADP
- ◆ NAD Testosteron $\rightarrow$ Androstendion, 17 β -HSD
- Kontrolle ohne Phospholipasen, $E_2 \rightarrow E_1$, 17 β -HSD

Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (=100%)



Abb. 8 Inaktivierung der 17β -HSD-Aktivitäten in Abhängigkeit von Verhältnissen Mikrosomenprotein (in mg) zu Phospholipase A- bzw. D-Aktivität (in μ g). Versuchsbedingungen: 22 mg Mikrosomenprotein in 3 ml Phospholipase A: 0,01 M Tris/HCl (pH 8,0), Phospholipase D: 0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,0), 37°C, 30 min. Einheiten siehe Abschnitt 2.



Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (=100%).

3.2.2. Reaktivierung der mikrosomalen 17β -HSD nach Inaktivierung durch Phospholipase A bzw. D

Die nach Einwirkung von Phospholipase A bzw. D für 30 min partiell inaktivierte 17β -HSD konnte durch Inkubation mit micellar verteilten definierten Phospholipoiden bzw. einer Phospholipoidgesamtfraktion aus Humanplacenta-Mikrosomen bei pH 7,4 (0,15 M Phosphat-Puffer) in unterschiedlichem Ausmaß reaktiviert werden (Abb. 9a und 9b). Um einen maximalen Wert zu erhalten, müssen 0,1 ml mit 1,4 μ g Phospholipoid oder 0,1 ml Phospholipoidlösung den Reaktivierungsgesetzten zugegeben werden. Wichtig ist, daß nach Sphingomyelin-, Lecithin- und Mikrosomengesamtphospholipoidzusatz die spezifische Aktivität der 17β -HSD höher liegt als in unbehandelten Mikrosomen (=Kontrolle).

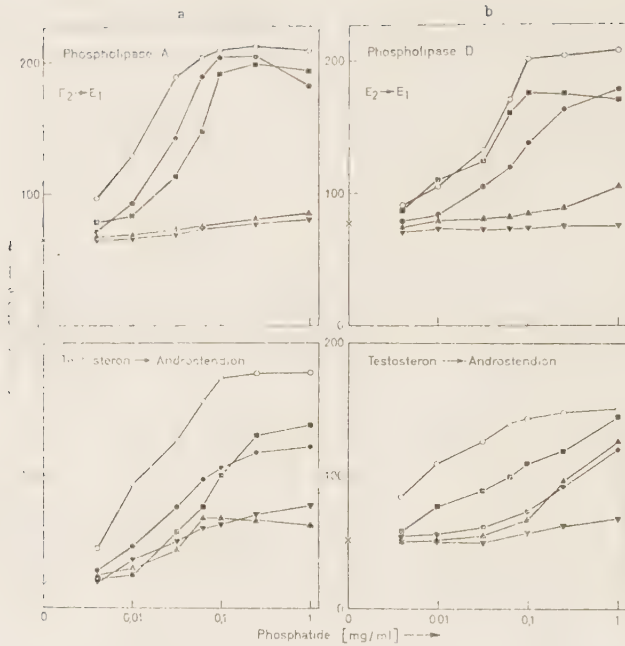


Abb.9 Reaktivierung der durch Phospholipase A (Abb.9a) bzw. Phospholipase D (Abb.9b) inaktivierten mikrosomalen 17β -HSD durch Phospholipide. Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 2.

- Lecithin ▲ Phosphatidyläthanolamin
- Sphingomyelin ▼ Phosphatidylserin
- Gesamtphospholipoidoide der Humanplacenta-Mikrosomen, die durch Extraktion nach Folch(39) gewonnen wurden.

Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (=100%)

3.2.3. Phospholipoid- und 17 β -HSD-Aktivitätsverteilung in nativen und Phospholipase A bzw. D behandelten Mikrosomen nach Zonalzentrifugation

Werden die zweimal gewaschenen nativen Mikrosomen über einen linear ansteigenden Dichtegradienten aus Saccharose unter den im Abschnitt 2 beschriebenen Bedingungen zentrifugiert (Abb.10), zeigt sich eine kontinuierlich Verteilung der einzelnen Proteinfractionen zwischen 1,36 bis 1,39 (n_D^{20}).

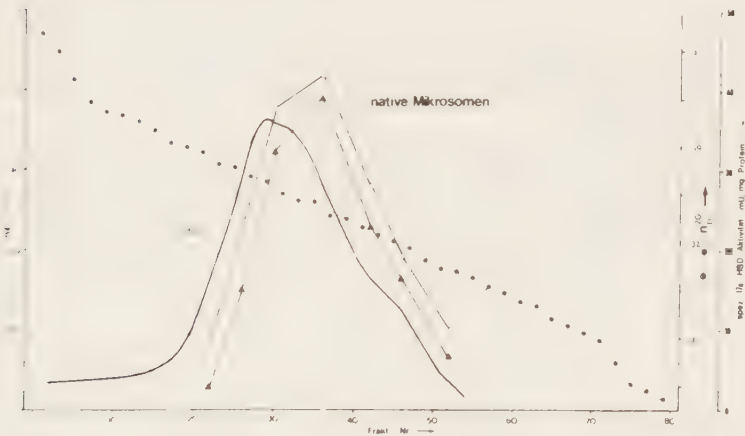


Abb.10 Zonenzentrifugation zweimal gewaschener nativer Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten (12-55proz. G/V). Einzelheiten siehe Abschnitt 2. Ordinat: Proteingehalt der Mikrosomenfraktion in % der Transmission (254 nm), Dichte des Mediums (n_D^{20}), spezifische 17 β -HSD-Aktivität (Δ $E_2 \rightarrow E_1$, $\blacktriangle$ Testosteron $\rightarrow$ Androstendion). Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

Das Maximum der spezifischen 17 β -HSD-Aktivität fällt nicht mit dem Maximum der Proteinelutionskurve zusammen; es ist einer weniger dichten Partikelpopulation zuzuordnen. Nach Phospholipase A- bzw. D-Behandlung der Mikrosomenfraktion sedimentieren die mikrosomalen Subpartikel in den verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten in einer heterogenen Verteilung (Abb.11 und 12). Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 36 h hat keinen zusätzlichen Einfluß auf das Sedimentationsverhalten. Die 17 β -HSD zeigt eine über die verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten unterschiedliche Verteilung auf schwere und weniger schwere

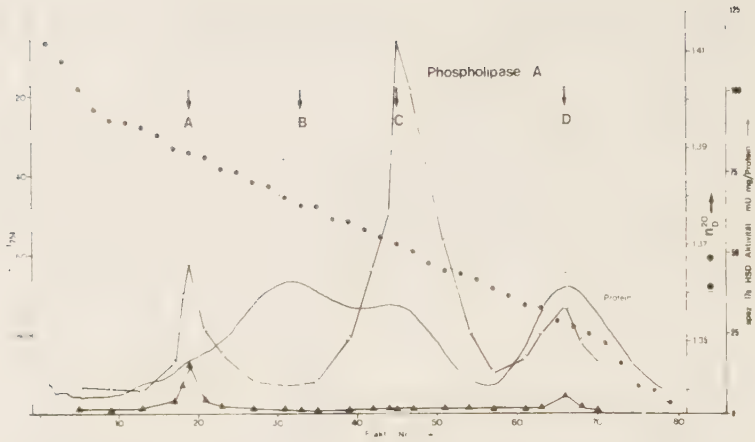


Abb. 11 Zonenzentrifugation von Phospholipase A-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml 0,01 Tris/HCl, $2,5 \cdot 10^{-3} M$ $CaCl_2$ (pH 8,0) bei $37^\circ C$ mit 1,1 mg Phospholipase A inkubiert. Die Reaktion wurde durch $6,6 \cdot 10^{-3} M$ EDTA-Zugabe beendet. Einzelheiten siehe Abschnitt 2. Symbole siehe Legende zu Abb. 10. Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

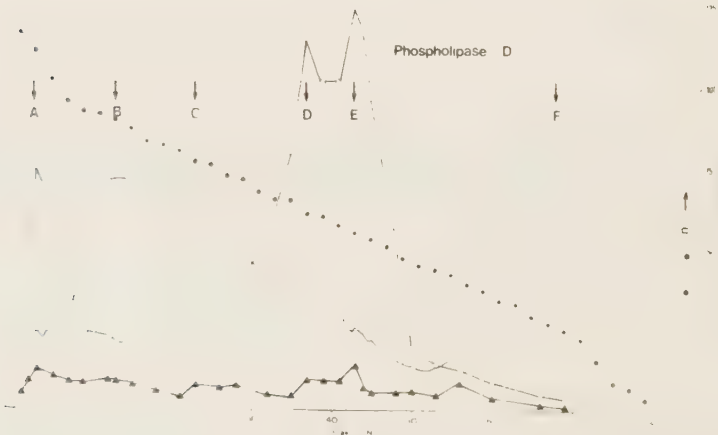


Abb. 12 Zonenzentrifugation Phospholipase D-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml 0,1 M Acetat-Puffer, $2,5 \cdot 10^{-3} M$ $CaCl_2$ (pH 5,6) bei $37^\circ C$ mit 37 mg Phospholipase D inkubiert. Einzelheiten siehe Abschnitt 2. Symbole siehe Legende zu Abb. 10. Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

Mikrosomensubfraktionen. Die E_2 -umsetzende 17 β -HSD reagiert gegenüber Phospholipase-Hydrolyse weniger empfindlich als das Testosteron-umsetzende Enzym. Die Tab.3 enthält Angaben über die spezifische 17 β -HSD-Aktivität und den Phospholipoidgehalt der Originalmikrosomen und in den in Abb. 11 und 12 bezeichneten Fraktionen des Dichtegradienten. Nach diesen Ergebnissen wird nach Phospholipase-Hydrolyse die E_2 -"-sensitive" 17 β -HSD gegenüber der Aktivität in nativen Mikrosomen etwa 3fach angereichert(jeweils aktivste Fraktion). Außerdem wird deutlich, daß die nach Phospholipase-Hydrolyse sich in den Dichtegradienten heterogen verteilenden Mikrosomensubfraktionen unterschiedliche Phospholipoid-Muster aufweisen, wobei ein relativ hoher Sphingomyelin- bzw. Lecithingehalt mit einer relativ hohen spezifischen Enzymaktivität korreliert ist.

Fraktion	Protein (mg/0,1ml)	Gesamt- Phospho- lipoid (nÄquiv.P/mg Protein)	Sphingo- myelin	Lecithin	Phosphati- dylinosit + Phosphati- dylserin	Phosphati- dyläthanol- amin	Spez. Akt 17 β -HSD I II
							(mU/mg Prot)
native Mikrosomen	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9	42 40,2
Phospholipase A- Zonallauf (Abb.11)							
A	0,15	23	5,1	7,3	2,7	7,9	48 18,3
B	0,59	38	11,3	15,8	33,4	27,5	9,6 1,0
C	0,45	67	15,7	25,3	6,8	19,2	123 0,6
D	0,53	79	21,8	25,3	12,8	19,1	42 6,8
Phospholipase D- Zonallauf (Abb.12)							
A	0,14	21	7,3	5,8	2,3	5,6	81,8 10,3
B	0,72	108	16,3	21,3	33,8	34,6	23,2 7,8
C	0,57	86	28,3	21,3	13,8	22,6	32,8 6,3
D	0,29	43	17,3	9,3	6,1	10,3	116,8 8,4
E	0,15	23	8,3	3,8	3,1	7,8	124,8 10,1
F	0,52	78	11,3	15,3	18,1	33,3	4,1 1,6

Tab.3 Phospholipoidgehalt und 17 β -HSD-Aktivitätsverteilung verschiedener Fraktionen von Zonalläufen Phospholipase A und D behandelter Humanplacenta-Mikrosomen(Abb.11 und 12). I: $E_2 \rightarrow E_1$, II: Testosteron $\rightarrow$ Androstendion

3.2.4. Reinigung der mikrosomalen 17 β -HSD

Die nach Aufschluß der Mikrosomen mit Phospholipase A und anschließender Zonalzentrifugation der hydrolysierten Mikrosomen in einem linearen Saccharose-Dichtegradienten(Abb.11) erhaltene Fraktion D(Frakt. Nr. 60-75) wurde zur Anreicherung der E_2 - und der Testosteron-"sensitiven" 17 β -HSD vier Einzelschritten, die in der Tab.4 zusammengefaßt dargestellt sind, unterworfen: fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$ -fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Isoelektrofokussierung.

Reinigungsstufe	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (nU)		Spez. Aktivität (mU/mg Prot.)		Ausbeute (%)		Anreicherung (n-fach)	
		E ₂	Test.	E ₂	Test.	E ₂	Test.	E ₂	Test.
Native Mikrosomen	112	4704	4502	42	40,2	100		-	
Fraktion D nach Zonal- lauf Phospholipase-A- behandelter Mikrosomen	28	924	713	33	25,5	19,6	24,3	-	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-50% Sät- tigung	11,3	814	511	72	45,2	17,3	18,1	1,7	1,2
Agarose	3,8	802	468	211	123	17	15,9	5,0	3,1
DEAE-Sephadex	1,2	502	391	418	324	10,7	14,6	10,0	8,1
Isoelektrofokussierung aktivste Fraktion	0,45	487	314	1083	698	10,4	12,9	25,8	17,4

Tab.4 Isolierung der E₂- und der Testosteron-"sensitiven" 17 β -HSD aus Humanplacenta-Mikrosomen

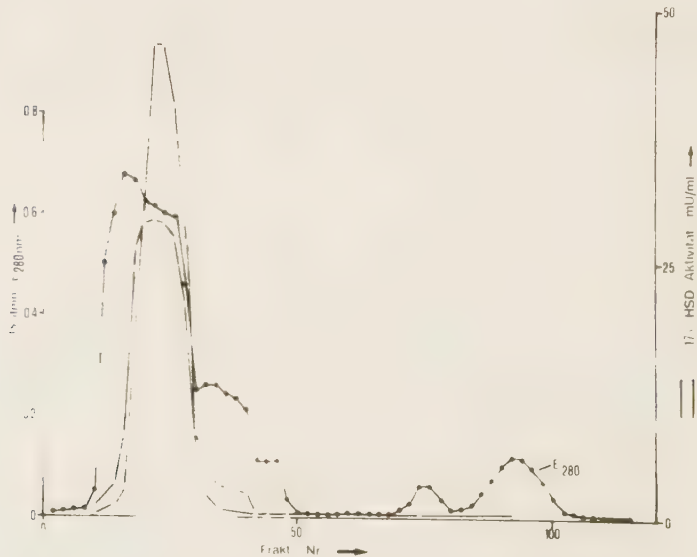


Abb.13 Agarose-Gelfiltration eines (NH₄)₂SO₄-Präzipitats mikrosomaler Subpartikel, die nach Zonzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhalten wurden. Die nach Zonzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhaltenen Fraktionen (60-75, Abb.11) wurden nach Dialyse gegen Medium I einer fraktionierten (NH₄)₂SO₄-fällung unterworfen. Das enzymaktive Präzipitat (40-50% Sättigung) wurde in 3 ml Medium I gelöst und auf eine BioGel A-0,5m Säule (90 cm x 1,5 cm) aufgetragen und mit äquilibrierendem Puffer (Medium I) eluiert. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

● Protein ▽ E₂ → E₁, 17 β -HSD
 △ Testosteron > Androstendion, 17 β -HSD

Das nach 40%-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung gewonnene enzymaktive Präzipitat wurde an BioGel A-0,5m chromatographiert (Abb.13). Die 17 β -HSD eluierte als einheitlicher Gipfel; die Enzympräparation wurde anschließend über eine DEAE-Sephadex-Säule mit einem linearen Phosphat-Konzentrationsgradienten eluiert (Abb.14). Die so gewonnene Enzympräparation wurde durch Isoelektrofokussierung (pH-Gradient 3,5-10) in zwei 17 β -HSD aktive Proteinfractionen separiert, wobei die bei pH 6,0 präzipitierende die E_2 - "sensitive" 17 β -HSD Aktivität enthielt und die bei pH 4,9 die Testosteron-"sensitive" (Abb.15). Die E_2 - "sensitive" 17 β -HSD (Fraktion A) wurde 25,8fach und die Testosteron-"sensitive" 17 β -HSD (Fraktion B) 17,4fach angereichert (Tab.4).

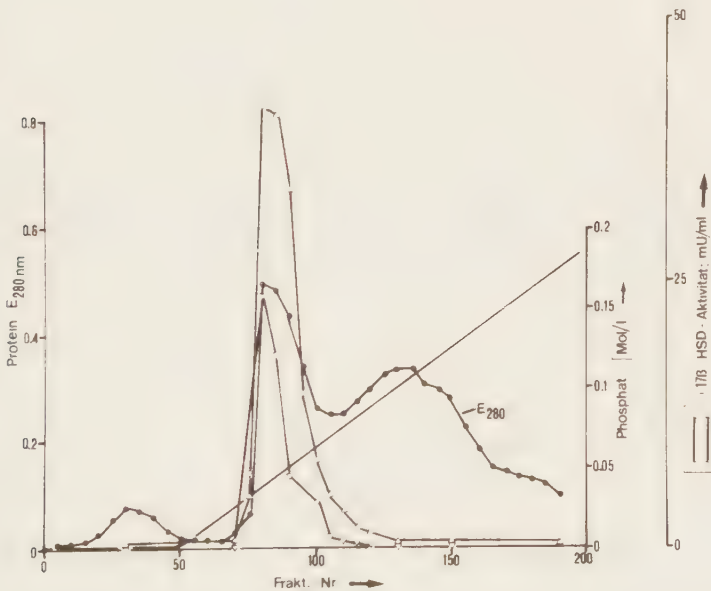


Abb.14 DEAE-Sephadex-Ionenaustauschchromatographie der enzymaktiven Fraktionen nach Agarose-Gelfiltration (Abb.13). Die Chromatographiesäule (30 cm x 1,5 cm) wurde mit Medium I äquilibriert, die Enzympräparation (Agarosesäulen-eluat) mit 50 ml Medium I in die Säule eingewaschen und die Proteine mit einem linearen Puffergradienten aus Medium I und II eluiert. Einzelheiten siehe Abschnitt 2. Symbole siehe Abb.13.

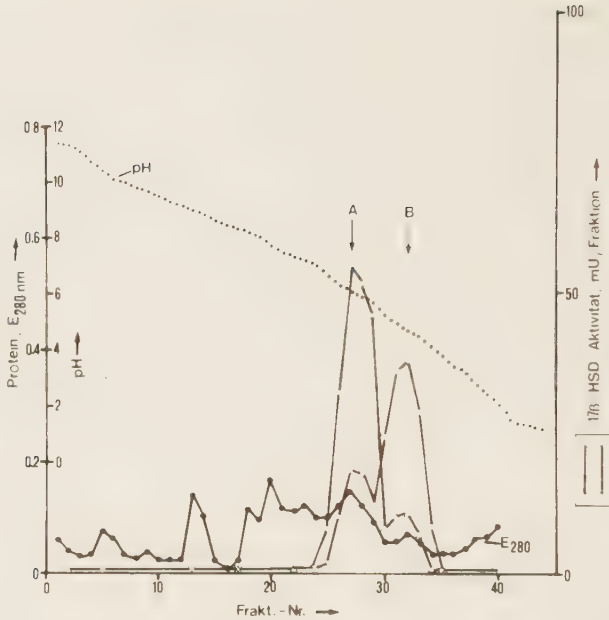


Abb.15 Isoelektrofokussierung in einer pH-Gradiente 3,5-10 der enzymaktiven Fraktionen nach DEAE-Sephadex-Ionenaustauschchromatographie. 110 ml LKB Elektrofokussiersäule, automatisch hergestellte Saccharose-Dichtegradiente, Trägerampholyte pH 3,5-10. Einzelheiten siehe Abschnitt 2. pH-Wert wurde in jeder Einzelfraktion bestimmt. Symbole siehe Abb.13

Die proteinchemische Einheitlichkeit der gereinigten 17 β -HSD Aktivitäten wurde durch Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-gel geprüft. Die Lage des enzymaktiven Proteinpräzipitats wurde durch enzymespezifische Anfärbung in vitro - wie in Abschnitt 2 beschrieben - ermittelt. Zwei dicht beieinander liegende Proteinbanden (pH 6,0 und pH 4,9) unterschiedlicher Farbintensität repräsentierten die 17 β -HSD Aktivitäten (Abb.16). Verunreinigungen durch Fremdproteine waren in den reinsten Präparationen zu vernachlässigen.



Abb.16 Densitometrie der nach DEAE-Sephadex-Chromatographie durch Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung (pH 3,5-10) separierten aktiven Fraktionierung. Spezifische 17 β -HSD Aktivitätsfärbung mit E₂ als Substrat und NAD als Coenzym. Einzelheiten sind in Abschnitt 2 dargestellt.

3.2.5. Molekulargewicht

Die Molekulargewichte der E₂-"sensitiven" bzw. der Testosteron-"sensitiven" 17 β -HSD wurden mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichts durch vergleichende Gelfiltration an Agarose-Gel (BioGel A-0,5m) zu 93 000 bzw. 192 000 ermittelt (Abb.17). Zur weiteren Absicherung der Molekulargewichte müßten allerdings weitere Methoden, wie z.B. Verhalten bei Dichtegradienten-Zentrifugation und Dodecylsulfat-Elektrophorese herangezogen werden.

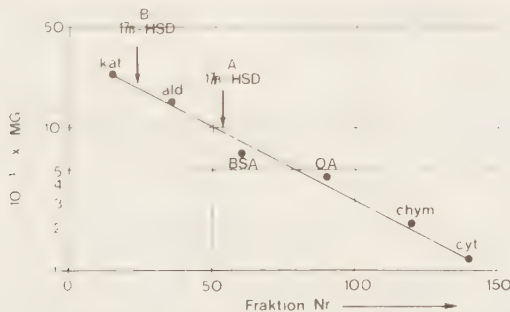


Abb.17 Bestimmung der Molekulargewichte der aus der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta separierten 17 β -HSD durch Gelfiltration. A: Fraktion A nach Isoelektrofokussierung B: Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Bedingungen: BioGel A-0,5m (Säule 90 x 1,5 cm), 4°C. Elution mit Medium I. Eichproteine: kat = Katalase, ald = Aldolase, BSA = Rinderserumalbumin, QA = Ovalbumin, chym = Chymotrypsinogen A, cyt = Cytochrom c, 17 β -HSD = 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

3.3. Kinetische Eigenschaften der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen 17 β -HSD

Die in den Abb. mit A und B bezeichneten Enzympräparationen entsprechen den nach Isoelektrofokussierung angereicherten und separierten mikrosomalen 17 β -HSD Aktivitäten. Wie Tab.5 zeigt, ist die aus der Mikrosomenfraktion isoliert dargestellte 17 β -HSD (Fraktion A) relativ stabil. Nach 24 h Aufbewahrung bei 4°C wurde eine Aktivitätsabnahme von 18% beobachtet. E₂ und NAD zeigen einen Stabilisierungseffekt, Glycerin ist weitgehend wirkungslos.

Substanzen	Konzentration	Restaktivität nach Aufbewahren bei 4°C für		
		1 h	12 h [%]	24 h
keine	—	98	89	82
NAD ⁺	10 μ M	100	96	91
NADP ⁺	10 μ M	100	100	97
E ₂	10 μ M	100	100	100
Glycerin	10 %	98	87	63
	20 %	98	92	85

Tab.5 Stabilisierungseffekt verschiedener Substanzen auf die mikrosomale 17 β -HSD Aktivität (Fraktion A nach Isoelektrofokussierung). Gemessen wurde für die 17 β -HSD Aktivität für E₂ und NAD nach Aufbewahren der Enzympräparation für 1, 12 bzw. 24 Stunden bei 4°C. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

3.3.1. Proteinmenge und Zeit

Der Abb.18 ist zu entnehmen, daß die Beziehung zwischen Oxydation von E₂ bzw. Testosteron und der Enzymproteinkonzentration bis zu einer Menge von 0,023 mg(0,05 ml) Enzymprotein linear ist.

Wie aus der Abb.19 hervorgeht, verläuft die Reaktion bis 15 min über die Zeit linear. Damit ist sichergestellt, daß bei 15 min Inkubationsdauer und 0,05 ml Enzymlösung Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktionen gemessen werden.

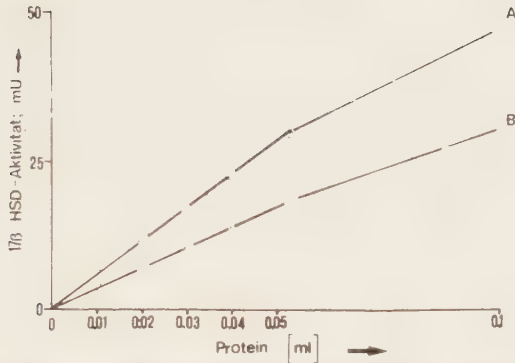


Abb. 18 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten der Oxydation von E_2 (Δ) und Testosteron (∇) in Abhängigkeit von der Proteinmenge der nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17 β -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A: Fraktion A nach Isoelektrofokussierung, B: Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Inkubation: 10 μ M 14 C- E_2 bzw. 14 C-Testosteron, 0,1 mg NAD^+ /Ansatz, wurden für 15 min bei 37°C unter Luftzutritt in 0,15 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml inkubiert. 0,1 ml entsprechend 45 μ g angereichertes Enzymprotein.

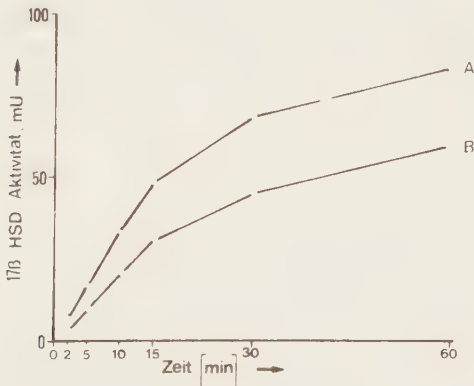


Abb. 19 Zeitabhängigkeit der Oxydation von E_2 (Δ) und Testosteron (∇) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17 β -HSD Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B wie in Abb. 18. Inkubation: je 0,1 ml (=45 μ g Enzymprotein) wurden in 0,15 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml unter Luftzutritt inkubiert. NAD^+ 0,1 mg pro Ansatz, 10 μ M 14 C- E_2 bzw. 14 C-Testosteron.

3.3.2. pH-Optimum

Abb.20 zeigt den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und der Pufferzusammensetzung auf die Aktivität der angereicherten 17 β -HSD. In Glycin/NaOH-Puffer liegt das pH-Optimum der enzymatischen Transformation von E₂ nach E₁ bzw. Testosteron nach Androstendion zwischen pH 9,3 und pH 9,6.

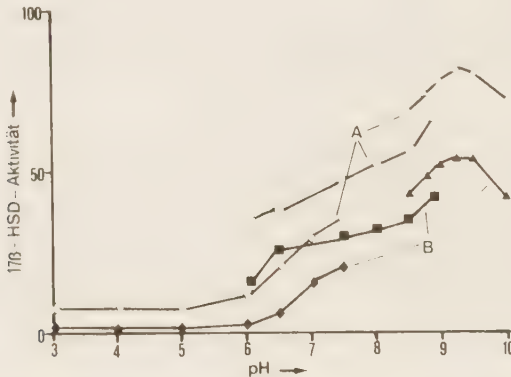


Abb.20 pH-Optimum der Oxydation von E₂ (△, □, ◇) und Testosteron (▲, ■, ◆) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierte, angereicherte und separierte 17 β -HSD-Aktivitäten. A und B wie in Abb.18. Inkubationen siehe Legende zu Abb.19, Inkubationsdauer 15 min.

■ □ 0,15 M Phosphat-Puffer ▲ △ 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer
 ◆ ◇ 0,2 M Na₂HPO₄/Citronensäure-Puffer

3.3.3. Temperaturoptimum und Hitzestabilität

Bei steigenden Temperaturen wurden in Gegenwart von Sättigungskonzentrationen von E₂ und Testosteron die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten (Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung) von der Temperatur gemessen (Abb.21). Beide Enzymproteine zeigten einen Anstieg der Produktausbeuten bis ca. 42°C. Bei Temperaturen oberhalb 45°C tritt Hitzedenaturierung der Enzympräparationen ein.

Auffallend ist die Hitzestabilität der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen 17 β -HSD. Wie aus Abb.22 hervorgeht, muß

die Enzymlösung zur vollständigen Inaktivierung des katalytisch wirksamen Proteins mindestens 30 min auf 60°C erhitzt werden.

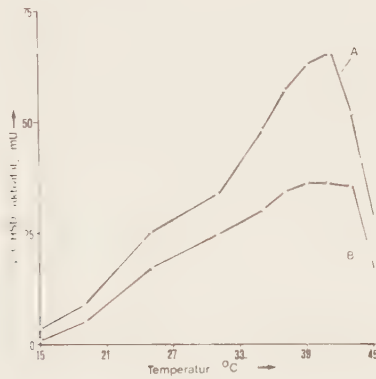


Abb. 21 Temperaturoptimum der Oxydation von E_2 (Δ) und Testosteron (∇) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierete, angereicherte und separierte 17β -HSD Aktivität aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B siehe Legende zu Abb. 18. Inkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 19, Inkubationsdauer 15 min.



Abb. 22 Hitzestabilität der nach Phospholipase A Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17β -HSD Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. $\circ \square \Delta$: $E_2 \rightarrow E_1$, Fraktion A nach Isoelektrofokussierung.

$\bullet \blacksquare \blacktriangle$: Testosteron $\rightarrow$ Androstendion, Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Die im Endschritt durch Isoelektrofokussierung angereicherten 17β -HSD Aktivitäten wurden bei verschiedenen Temperaturen in 0,15 M Phosphat-Puffer bei 30 min ohne Substrat vorinkubiert (0,1 ml = 45 μ g angereichertes Enzymprotein). Enzymaktivitätsbestimmung vergleiche Legende zu Abb. 18.

3.3.4. Bestimmung der Michaeliskonstanten für E_2 und Testosteron

Die Michaeliskonstanten (K_m -Werte der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen 17 β -HSD (Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung) für E_2 bzw. Testosteron und NAD wurden aus den Reaktionsgeschwindigkeiten, die bei jeweils gleichbleibendem Proteingehalt und variabler Substrat- und konstanter Coenzym-Konzentration gemessen worden sind, nach Lineweaver und Burk graphisch ermittelt. Sie betragen:

K_m (Fraktion A, E_2)	$4,5 \cdot 10^{-6}$ M (Abb.23a)
K_m (Fraktion B, E_2)	$25,0 \cdot 10^{-6}$ M (Abb.23a)
K_m (Fraktion A, Testosteron)	$5,6 \cdot 10^{-6}$ M (Abb.23b)
K_m (Fraktion B, Testosteron)	$18,2 \cdot 10^{-6}$ M (Abb.23b)



Abb.23 Bestimmung scheinbarer K_m -Werte für die Oxydation von E_2 (Δ) und Testosteron (∇) durch die nach Phospholipase A Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17 β -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B siehe Legende zu Abb. 18. Inkubationsbedingungen: 0,15 M Phosphat-Puffer (pH 7,4), 37°C, 0,1 mg NAD/Ansatz, Gesamtvolumen 4,1 ml, Proteingehalt der angereicherten Enzymaktivitäten: 0,1 ml entsprechend 45 μ g.

2.3.5. Substrat- und Coenzym-Spezifität:

In Tab.6 ist das Verhalten der solubilisierten, angereicherten und separierten 17 β -HSD-Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung, der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta gegenüber verschiedenen Substraten und Coenzymen wiedergegeben. Mit NAD⁺ (isoliertes und gereinigtes Enzymprotein), als Wasserstoffacceptor ist E₂ für Fraktion A das bevorzugte Substrat, Fraktion B oxydiert dagegen Testosteron mit wesentlich größerer Geschwindigkeit als E₂. Alle geprüften Substrate zeigen mit NADP(H) einen geringeren Umsatz als mit NAD⁺(H). Bei hohen NAD⁺(P)-Konzentrationen wurde Coenzymhemmung beobachtet (Abb.24).

Eingesetztes Steroid (10 μ M)	Nachgewiesenes Reaktionsprodukt	Coenzym (10 ⁻⁴ mg/Ansatz)	17 β -HSD Aktivität Fraktion A (rel. %)	Fraktion B (rel. %)
Östradiol-17 β	Östron	NAD	100	12
		NADP	32	3,2
Testosteron	Androstendion	NAD	17	100
		NADP	6,2	23
Östron	Östradiol-17 β	NAD ⁺	56	8,7
		NADP ⁺	12	1,9
Androstendion	Testosteron	NAD ⁺	6,2	48
		NADP ⁺	1,3	12
Progesteron	20 α -hydroxy-4-androsten-3on	NAD ⁺	2,2	3,5
		NADP ⁺	0,3	1,2

Tab.6 Substratspezifität der nach Phospholipase-A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17 β -HSD-Aktivitäten aus Humanplacentamikrosomen. Fraktion A und B: angereicherte 17 β -HSD-Aktivitäten nach Isoelektrofokussierung.



Abb.24 Coenzymabhängigkeit der durch Isoelektrofokussierung separierten 17 β -HSD-Aktivitäten der Humanplacenta. Inkubation: 10 μ M ¹⁴C-E₂ bzw. ¹⁴C-Testosteron, 45 μ g Enzymprotein wurden für 15 min bei 37°C in 0,15 M Phosphatpuffer (pH 7,4, 4,1 ml Gesamtvolumen, bei steigenden Coenzym-Konzentrationen innewert.

NAD⁺ NADP⁺ Fraktion A nach Isoelektrofokussierung
NAD⁺ NADP⁺ Fraktion B nach Isoelektrofokussierung

3.4. Wasserstofftransfer zwischen C₁₇-von E₂ und C₁₇-von Androstendion

Die in Tab.7 zusammengefaßten Wasserstofftransfer-Eigenschaften verschiedener Enzympräparationen der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta in bezug auf den Wasserstoffübergang von der 17-Position von E₂ auf die C₁₇-Oxogruppe von Androstendion unter Bildung von Testosteron zeigen, daß die aus der Mikrosomenfraktion durch Aussalzung, säulenchromatographische und isoelektrophoretische Trennverfahren separierten und angereicherten 17 β -HSD-Aktivitäten (Fraktion A und B) isoliert für sich nur einen geringen Wasserstofftransfer katalysieren.

Enzympräparation	Coenzym (0,1 mg/Ansatz)	% der eingesetzten ³ H-Aktivität ³ H-Testosteron
Native Mikrosomen	NAD	68,2
(2mal gewaschen)	NADP	12,8
Fraktion A nach	NAD	7,8
Isoelektrofokussierung	NADP	1,2
Fraktion B nach	NAD	3,5
Isoelektrofokussierung	NADP	0,5
15 min bei 37°C rekombinierte 17 β -HSD-Aktivitäten	NAD	37,3
	NADP	5,2

Tab.7 Ausmaß des durch verschiedene Enzympräparationen katalysierten Wasserstofftransfers zwischen C₁₇ von E₂ und Androstendion. Wasserstoffdonator: (17-³H)-E₂, Wasserstoffacceptor: nicht radioaktiv-markiertes Androstendion. Einzelheiten siehe Abschnitt 2.

Dagegen sind die Original-Mikrosomen und die freien isolierten Einzelenzyme nach Rekombination durch 15minütige Inkubation bei 37°C in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, in der Lage, einen hochaktiven Wasserstofftransfer zwischen C₁₇ von E₂ und C₁₇ von Androstendion zu bewirken.

Abb.25 zeigt die Einflüsse von Temperatur und Zeit auf das Rekombinationsverhalten der aus der Mikrosomenfraktion isolierten 17 β -HSD zu einem assoziativen Komplex. 10minütige Inkubation bei 43°C in 0,15 M Phosphat-Puffer hat den stärksten Effekt in bezug auf die Rekombination und auf die Wie-

dergewinnung der Wasserstofftransfer-Eigenschaften der isolierten mikrosomalen 17 β -HSD. Verlängerung der Inkubationszeit führt zu einem steilen Abfall der "Transhydrogenase-Aktivität" des Rekombinationskomplexes.

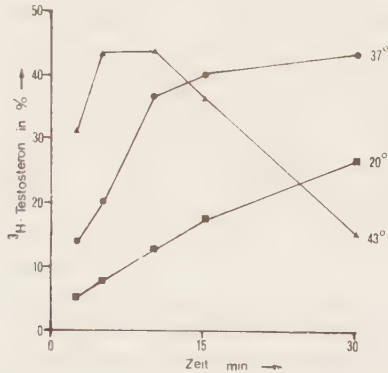


Abb.25 Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Rekombination zweier aus der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta nach Phospholipase A Behandlung solubilisierter, angereicherter und separierter 17 β -HSD Aktivitäten. Zur Rekombination wurden die lyophilisierten Enzympräparationen (Fraktion A und B) in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, gelöst (1 mg/ml) und bei verschiedenen Temperaturen bis 30 min inkubiert. Die "Transhydrogenase-Aktivität" wurde, wie in Abschnitt 2 beschrieben, jeweils aus einem Aliquot bestimmt, Inkubationsdauer 10 min bei 37°C. Die gemessene Größe ist der Einbau von E₂-Wasserstoff in die C₁₇-Position von Androstendion unter Bildung von Testosteron. Ordinate: ³H-Testosteron-Bildung in % der eingesetzten (17-³H)E₂-Radioaktivität.

In Abb.26 ist der durch Rekombination der freien aus der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta isolierten 17 β -HSD-Aktivitäten bewirkte Wasserstofftransfer zwischen E₂ und Androstendion in Abhängigkeit vom Puffersystem und vom pH-Wert dargestellt. Phosphat-Puffer ist wirkungsvoller als Na₂HPO₄/Citronensäure-Puffer, das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,3 und pH 7,0.

Abb.27 zeigt, daß mit zunehmender E₂-Konzentration (Wasserstoffdonator) bei konstanter Androstendion-Konzentration (Wasserstoffacceptor) die Ausbeute des Reduktionsäquivalents, spezifische C₁₇-E₂-Wasserstoffanlagerung an C₁₇ von Androstendion unter Bildung von Testosteron, zunimmt.

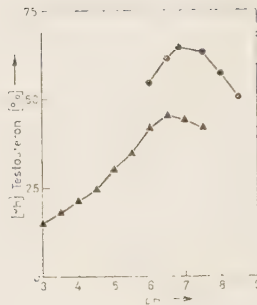


Abb.26 Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen C_{17} von E_2 und C_{17} von Androstendion vom pH-Wert. Enzympräparation: die bei 37°C für 15 min in 0,15 M Phosphat-Puffer(pH 7,4) rekombinierten 17β -HSD Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. "Transhydrogenase-Aktivitäts"-Bestimmung siehe Abschnitt 2. Ordinate: ^3H -Testosteron-Bildung in % der eingesetzten ($17-^3\text{H}$)- E_2 -Radioaktivität.

● 0,15 M Phosphat-Puffer ▲ 0,2 M Na_2HPO_4 /Citronensäure

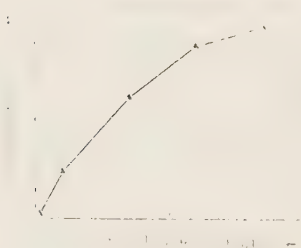


Abb.27 Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen C_{17} von E_2 und C_{17} von Androstendion von der E_2 -Konzentration. Enzympräparation: die bei 37°C für 15 min in 0,15 M Phosphat-Puffer(pH 7,4) rekombinierten 17β -HSD Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. "Transhydrogenase-Aktivitäts"-Bestimmung siehe Abschnitt 2. Ordinate: ^3H -Testosteron-Bildung in % der absoluten Menge transferierten E_2 - C_{17} -Wasserstoffs.

4. Diskussion

4.1. Einfluß der Phospholipide in Humanplacenta-Mikrosomen auf die Aktivität der 17 β -HSD

Die geschilderten Ergebnisse, wonach die im endoplasmatischen Retikulum der Humanplacenta strukturgebundene 17 β -HSD sowohl durch Inkubation mit Phospholipase A bzw. D als auch durch Phospholipoidextraktion mit organischen Lösungsmitteln (Aceton/Wasser, Aceton/Butanol) inaktiviert wird, zeigen, daß Membranlipide aktivierend auf die mikrosomale 17 β -HSD einwirken. Die mikrosomal gebundenen Phospholipide sind - wie an Hand von Modellversuchen entwickelte Vorstellungen vermuten lassen - durch hydrophobe Wechselwirkung, Wasserstoff-Brücken und ionische Bindungen ("ion pairing" zwischen den basischen Aminosäureresten und den Phosphatgruppen der Phospholipide) mit den Membranlipiden verknüpft (30, 47-49). Phospholipase A hydrolysiert die an C-1 gebundene Fettsäure der Phospholipide unter Bildung von Lysolipiden; Phospholipase D spaltet den zwitterionischen Rest unter Bildung von Phosphatidsäuren ab. Die Inaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD als Folge des Phospholipoidverlustes ist reversibel. Durch Rekombination der mit Phospholipase oder organischen Lösungsmitteln behandelten Mikrosomen mit isolierten und gereinigten Phospholipiden oder mit einer durch Extraktion der Mikrosomen gewonnenen Fraktion natürlicher Membranlipide kann die Inaktivierung aufgehoben werden. Die Reaktivierung mit Lecithin oder Sphingomyelin ist wirkungsvoller als mit Phosphatidylthanolamin oder Phosphatidylserin. Auffallend ist, daß nach Sphingomyelin oder Lecithinzusatz die spezifische Aktivität der maximal reaktivierten 17 β -HSD weit höher liegt als in unbehandelten Mikrosomen. Eine Erklärung für die Steigerung der spezifischen Enzymaktivität der 17 β -HSD nach Zusatz von hochgereinigtem Phospholipoid über den Maximalwert von unbehandelten Mikrosomen ist einmal in der Tatsache zu suchen, daß beim Extraktions- oder Hydrolysevorgang Proteine verlorengehen, die Fremdaktivitäten bzw. Strukturproteine darstellen. Zum anderen ist nicht auszuschließen, daß die Phospholipide nicht nur als reine Strukturelemente im Mikro-

somenaufbau fungieren, sondern durch Wechselwirkung mit den strukturgebundenen Enzymaktivitäten eine Aktivierung und Stabilisierung der enzymatisch aktiven Konformation der Membranproteine erreichen. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Duttera et al. (48), Martonosi et al. (49) und Staudinger et al. (30), die sich mit der Korrelation zwischen Phospholipidgehalt und Enzymaktivität von membrangebundenen Enzymen (Glucose-6-Phosphatase, ATPase, NADH-Cytochrom-c-Reduktase, 3-Oxo-steroid- Δ^4 -Dehydrogenase, NADH: Semidehydroascorbinsäure-Oxidoreduktase) befaßt haben.

4.2. Mechanismus der Aktivierung mikrosomaler Enzymaktivitäten durch Phospholipide

Über den Mechanismus der enzymaktivitätserhaltenden Wirkung der Phospholipide auf mikrosomal gebundene Enzymaktivitäten kann keine verbindliche Aussage getroffen werden. Aus der Wirkung der Phospholipasen vom Typ A und D auf die Aktivität der mikrosomal gebundenen 17 β -HSD lassen sich aber Aussagen über den Mechanismus der Aktivierung mikrosomaler Enzymaktivitäten durch Phospholipide ableiten:

1. Es ist wahrscheinlich, daß die 17 β -HSD als stöchiometrischer Komplex des Enzymproteins mit Spingomyelin bzw. Lecithin, also als "Lipoprotein-Enzym" aufgefaßt werden kann, und nicht - wie von Staudinger et al. (50) für die NADH:Semidehydroascorbinsäure-Oxidoreduktase beschrieben - auf micellarer Ebene von den Membranlipiden als oberflächenaktive Substanzen unspezifisch beeinflusst wird. 2. Die nach Hydrolyse gebildeten Lysolipide und Phosphatidsäuren stabilisieren die enzymatisch aktive Konformation der in der phospholipidreichen Mikrosomenlamelle fixierten 17 β -HSD nicht.

4.3. Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und Charakterisierung der mikrosomal gebundenen 17 β -HSD

Die Zonalzentrifugationen haben gezeigt, daß durch Phospholipase-

Hydrolyse von Original-Mikrosomen unterschiedlich dichte Partikelpopulationen, die von der Größe der mikrosomalen Vesikel abhängen, gebildet werden. Die Mehrgipfligkeit der Verteilung der 17 β -HSD-Aktivität in den fragmentierten Mikrosomen - im Gegensatz zu der kontinuierlichen Aktivitätsverteilungskurve bei Auftrennung von unbehandelten Original-Mikrosomen durch Zonalzentrifugation - zeigt, daß Partikelpopulationen mit unterschiedlichem Enzymbesatz entstehen. Die im Startgipfel (Fraktion D, Abb. 11) des Zonallaufs Phospholipase A-behandelter Mikrosomen repräsentierten Partikelpopulationen niedriger Dichte bzw. Proteine, die aus dem durch Phospholipase-Hydrolyse zerstörten integrierten Membranverband abgelöst wurden, wurden durch klassische Methoden der Reinigung von löslichen Enzymaktivitäten in ein E₂- "sensitives" und ein Testosteron- "sensitives" 17 β -Enzym separiert. Der Reinheitsgrad war charakterisiert durch einen Anreicherungsfaktor von 25,8 für E₂-17 β -HSD bzw. 17,4 für Testosteron-17 β -HSD.

Offenbleiben muß die Frage, ob die im Endreinigungsschritt durch Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten 3,5-10 im Säulen- bzw. Polyacrylamidgel-Verfahren gewonnenen isoelektrischen Punkte für die 17 β -HSD-aktiven Fraktionen A und B, denen der "natürlichen" in die Membran eingebetteten Enzymproteine entsprechen. Es muß in Betracht gezogen werden, daß die mit der Proteinstruktur eng verflochtenen Phospholipoide Teile der Proteinoberfläche maskieren, so daß nach partiellem Proteinverlust durch Phospholipase-Hydrolyse Proteinbezirke freigesetzt werden, die eine Veränderung des Wanderungsverhaltens der separierten mikrosomalen 17 β -HSD-Enzymproteide im elektrischen Feld bewirken. Argumente hierfür liefert die Beobachtung, daß nach Aceton-Extraktion der Mikrosomenmembran, die zu einem Gesamtphospholipoid-Verlust von ca. 65% führt, die gewonnenen 17 β -HSD-aktiven Proteinzonen nach Isoelektrofokussierung bei anderen isoelektrischen Punkten (pH 7,2 und pH 5,8) präzipitieren.

Die Frage, ob das Vorliegen multipler Enzymformen der mikrosomalen 17 β -HSD mit verschiedenen isoelektrischen Punkten und

Molekulargewichten strukturelle Ursachen hat oder ob es sich um verschiedene Assoziationsformen der gleichen Untereinheit handelt, muß offenbleiben, da noch zu wenige Befunde darüber vorliegen. Für die zweite Möglichkeit spricht, daß der nach Gel-filtration zur weiteren Präparation vereinigte Molekulargewichtsbereich von etwa 85 000 bis 120 000 nach Ionenaustauschchromatographie und Isoelektrofokussierung in zwei 17 β -Hsd-aktive Proteinfractionen separierbar ist, die die Molekulargewichte von 192 000 bzw. 93 000 aufweisen. Das bedeutet, daß während der Reinigungsprozedur eine höhermolekulare Assoziationsform des "Untereinheitengewichts" von ca. 93 000 entstanden ist.

4.4. Vergleich einiger Eigenschaften der mikrosomalen 17 β -HSD mit der cytoplasmatischen 17 β -HSD

In der Tab.5 werden einige Eigenschaften der oben mit A und B bezeichneten durch Isoelektrofokussierung in einen pH-Gradienten 3,5-10 als Endreinigungsschritt rein dargestellten mikrosomalen Enzymproteine mit denjenigen des analogen cytoplasmatischen (7,19,20, 51-55) und denjenigen der nativen Mikrosomenfraktion (25,29) verglichen.

Parameter	cytoplasmatische 17 β -HSD 3-10	isolierte und gereinigte mikrosomale 17 β -HSD- Fraktionen A	B	native Mikrosomen ^{11,12}
K _m Östradiol	6,6·10 ⁻⁶ M (14,4·10 ⁻⁶ M)	4,5·10 ⁻⁶ M	18,2·10 ⁻⁶ M	2,2·10 ⁻⁶ M
Testosteron	400·10 ⁻⁶ M	25,0·10 ⁻⁶ M	5,6·10 ⁻⁶ M	
pH-Optimum (Oxydation)	9,8-10,2		9,3-9,6	7,8
Temperaturoptimum	41°C		42°C	42°C
Stabilität:				
Kälteinaktivierung	1 h, 0°C, Abnahme auf 40%	12h, 4°C, Abnahme auf 89%, gering		12h, 4°C, keine Abnahme
Glycerineffekt	1 h, 8°C, 20% Glycerin, keine Abnahme			-
Substratspezifität:				
Östradiol-Umsatz	hochaktiv	aktiv	gering	aktiv
Testosteron-Umsatz	gering	gering	aktiv	aktiv
Coenzym-spezifität:				
NAD ⁺	wirksam		wirksam	wirksam
NADPH	weniger wirksam		weniger wirksam	weniger wirksam
Sulphydrylreagenzien:				
p-Chlormercuribenzoat	hemmt vollständig		-	hemmt vollst. (10 ⁻³ M)
Jcdacetamid			-	hemmt zu 63% (10 ⁻³ M)
Zn-Ionen (10 ⁻⁷ -10 ⁻³ M)	Aktivierung um 35%		-	hemmt zu 19% (10 ⁻⁵ M)
Phospholipide	kein Einfluß		Aktivierung	Aktivierung
Molekulargewicht	62 000-65 000	93 000	192 000	unbekannt

Tab.5 Eigenschaften verschiedener 17 β -HSD der Humanplacenta

Die Interpretation der im direkten Vergleich in Tab.5 gegenübergestellten Wertepaare gestaltet sich schwierig, da störende Einflüsse auf die kinetischen Parameter durch interferierende, in der Membran fixierte Enzymsysteme nicht auszuschließen sind.

Die zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß das lösliche cytoplasmatische und die mikrosomal gebundenen 17 β -HSD-Aktivitäten nahezu gleiche Michaelis-Menten-Konstanten für E_2 und NAD sowie nahezu gleiche pH- und Temperatur-Optima haben. Beide subzellulär unterschiedlich verteilten Enzyme werden durch verschiedene Sulfhydrylreagenzien in vergleichbarer Weise beeinflusst. Das Verhalten der Enzyme gegenüber wasserstoffübertragenden Pyridinnukleotiden zeigt keine Unterschiede. Neben dieser Übereinstimmung in mehreren kinetischen Eigenschaften bestehen aber auch eine Reihe wichtiger Unterschiede zwischen der cytoplasmatischen und der membrangebundenen 17 β -HSD:

1. Zn-Ionen aktivieren die rein dargestellte cytoplasmatische 17 β -HSD; auf die mikrosomale 17 β -HSD haben Zn-Ionen einen hemmenden Einfluß.
2. Nach Zusatz von Phosphatidmicellen erfolgte eine Aktivitätssteigerung der membrangebundenen 17 β -HSD, dagegen wird die Aktivität der cytoplasmatischen 17 β -HSD nicht beeinflusst.
3. Aufbewahren des cytoplasmatischen Enzyms für 1 h bei 0°C hat einen Aktivitätsverlust von 60% zur Folge; die Aktivitätsabnahme der mikrosomalen Enzyme liegt bei weniger als 5%.
4. 20prozentiger Glycerin-Zusatz zur cytoplasmatischen Enzympräparation verhindert die Kälteinaktivierung durch Stabilisierung der enzymatisch aktiven Konformation. Der Glycerin-Einfluß auf die Stabilität der mikrosomalen Enzyme ist gering.
5. Untersuchungen zur Substratspezifität bzw. der Vergleich der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten (19,20) zwischen E_2 und Testosteron zeigen, daß die cytoplasmatische und die mit A bezeichnete isolierte und gereinigte mikrosomale 17 β -HSD E_2 spezifisch katalysieren, dagegen die Fraktion B Testosteron bevorzugt.

Bei Verwendung der nativen Mikrosomenpräparation sind die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Substrate etwa gleich groß. Die Unterschiede in der Substratspezifität zwischen der cytoplasmatischen 17 β -HSD und der in der Mikrosomenpräparation lokalisierten 17 β -HSD-Aktivität sind durch die Existenz zweier substratunterschiedlich katalysierender 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bedingt und nicht, wie Untersuchungen an bakteriellen und tierischen Hydrolasen (56,57) angedeutet haben, einer allosterischen Effektorwirkung der Phospholipide, die die Substratspezifität herabsetzt, zuzuschreiben. So hydroxyliert aus *Pseudomonas putida* isoliertes Cytochrom P-450 nur Campher zum entsprechenden 5-exo-Alkohol, das strukturgebundene Cytochrom P-450 der Leber-Mikrosomen mehrerer Säugetiere dagegen zahlreiche chemisch völlig verschiedene Metaboliten und Pharmaka.

4.5. Zellphysiologische Bedeutung zweier membrangebundener mikrosomaler 17 β -HSD-Aktivitäten

Abschließend soll die Frage nach der zellphysiologischen Bedeutung zweier membrangebundener, streng substratspezifisch katalysierender 17 β -HSD-Aktivitäten des endoplasmatischen Retikulums der Humanplacenta angeschnitten werden. Die Bedeutung liegt möglicherweise in der Katalyse eines spezifischen Wasserstofftransfers zwischen C₁₇ von E₂ und C₁₇ von Androstendion (siehe Abbn. 25-27). Die Integration von verschiedenen Steroid-Dehydrogenasen in einem mikrosomal-gebundenen Enzymkomplex würde erlauben, Wasserstoff im Rahmen einer "steroidbedingten Wasserstoffüberträgerkette" zwischen wasserstoffverbrauchenden, stoffwechselaktiven Mikrosomen-Kompartimenten und den im cytoplasmatischen "Sammelbecken" vorhandenen reduzierten Pyridinnucleotiden zu transferieren, zumal von der in analoger Weise als Doppellamelle strukturierten Mitochondrienwand bekannt ist, daß sie für reduzierte Pyridinnucleotide nicht frei diffusibel ist (vgl. Pollow et al. (30,31))

Wenzel et al. (32,58-60) kommen im Rahmen ihrer Untersuchungen zum spezifischen Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen

in der Mikrosomenfraktion von Rattenleber in Anlehnung an Untersuchungen von Gersham und Abeles(61) über das kinetische Verhalten von Leber-Alkoholdehydrogenase in Ab- und Anwesenheit von Lactataldehyd zu einer anderen Überlegung: Der spezifische Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen ist die Folge einer langsameren Dissoziation des binären NADH- als des Steroidsubstrat-Dehydrogenase-Komplexes kombiniert mit einer generellen substratspezifischen Katalyse der Steroiddehydrogenasen gegenüber verschiedenen Hydroxy-/Oxosteroid-Partnern. Diese pauschale Aussage zur Substratspezifität von Steroiddehydrogenasen - als unabdingbare Voraussetzung für den spezifischen Wasserstofftransfer zwischen zwei Steroid-Redoxpartnern - trifft zumindest für die in verschiedenen Zellkompartimenten gut untersuchte 17 β -HSD der Humanplacenta nicht zu (7,19,20,25,29,51-55). Von der 17 β -HSD ist eine strenge Substrat- und Coenzym-Spezifität bekannt. Es ist daher notwendig, die von Wenzel et al. an einem mikrosomalen Enzymsystem aufgestellte Hypothese an einer hochgereinigten löslichen Steroiddehydrogenase zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

Die partielle Extraktion von Phospholipoiden mit Aceton/Wasser bzw. Aceton/Butanol aus der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta führt zu einer partiellen Inaktivierung der 17 β -HSD, wobei der Aktivitätsverlust mit der Abnahme des Phospholipoidgehaltes streng korreliert ist. Durch Zusatz von Phospholipoiden (Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin) zur extrahierten Reststruktur der Mikrosomenfraktion können die Aktivitätsverluste rückgängig gemacht werden. Das Ausmaß der Reaktivierung ist abhängig von der Natur des zugesetzten Phospholipoids. Die spezifischen Aktivitäten der reaktivierten Enzyme sind teilweise größer als die Aktivitäten der aus Originalmikrosomen gewonnenen Fraktionen.

Bei der Phospholipoid-Hydrolyse der Mikrosomenfraktion aus Humanplacenta mit Phospholipase A bzw. D konnten gleiche bzw. sehr ähnliche Befunde erhoben werden.

Weiterhin wurde die Phospholipoid- und 17 β -HSD-Aktivitätsverteilung in nativen und Phospholipase A bzw. D-behandelten Mikrosomen nach Zonalzentrifugation untersucht. Die nativen Mikrosomen zeigen in einem linear ansteigenden Dichtegradienten aus Saccharose eine kontinuierliche Verteilung der einzelnen Proteinfraktionen. Das Maximum der spezifischen 17 β -HSD-Aktivität fällt nicht mit dem Maximum der Protein-elutionskurve zusammen; es ist einer weniger dichten Partikelpopulation zuzuordnen. Nach Phospholipase A- bzw. D-Behandlung der Mikrosomenfraktion sedimentieren die mikrosomalen Subpartikel in den verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten in einer heterogenen Verteilung. Die 17 β -HSD zeigt eine über die verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten unterschiedliche Verteilung auf schwere und weniger schwere Mikrosomensubfraktionen. Die E₂-umsetzende 17 β -HSD reagiert gegenüber Phospholipase-Hydrolyse weniger empfindlich als das Testosteron-umsetzende Enzym.

Die nach Aufschluß der Mikrosomen mit Phospholipase A und anschließender Zonalzentrifugation der hydrolysierten Mikrosomen in einem linearen Saccharose-Dichtegradienten erhaltene Fraktion D (Abb.11) wurde zur Reinigung und Anreicherung der E_2 - und der Testosteron-"sensitiven" 17 β -HSD vier Einzelschritten unterworfen: 1. Fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung, 2. Gelfiltration, 3. Ionenaustauschchromatographie und 4. Isoelektrofokussierung. Die so gewonnene Enzympräparation wurde nach der Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten von 3,5 bis 10 in zwei 17 β -HSD-aktive Proteinfractionen separiert, wobei die bei pH 6,0 präzipitierende die E_2 -sensitive 17 β -HSD-Aktivität enthielt und die bei pH 4,9 die Testosteron-sensitive. Die E_2 -sensitive wurde 25,8fach und die Testosteron-sensitive 17 β -HSD 17,4fach angereichert. Die Molekulargewichte der E_2 -sensitiven bzw. Testosteron-sensitiven wurden zu 93 000 bzw. 192 000 ermittelt.

Anschließend wurden die enzymkinetischen Parameter der beiden 17 β -HSD-Aktivitäten bestimmt:

1. Das pH-Optimum der enzymatischen Transformation von Östradiol nach Östron bzw. von Testosteron nach Androstendion lag zwischen pH 9,3 und 9,6.

2. Das Temperaturoptimum für beide 17 β -HSD-Aktivitäten wurde bei 42°C gefunden, bis zu dieser Temperatur wurde ein fortwährender Anstieg der Produktausbeuten gemessen. Bei 30 min Erhitzung auf mindestens 60°C trat eine vollständige Inaktivierung des katalytisch wirksamen Proteins ein.

3. Die Michaelis-Konstanten (K_m -Werte) der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen 17 β -HSD (Fraktion A und B) nach Isoelektrofokussierung wurden wie folgt ermittelt:

K_m (Fraktion A, E_2)	$4,5 \cdot 10^{-6} M$ (Abb.23a)
K_m (Fraktion B, E_2)	$25,0 \cdot 10^{-6} M$ (Abb.23a)
K_m (Fraktion A, Testosteron)	$18,2 \cdot 10^{-6} M$ (Abb.23b)
K_m (Fraktion B, Testosteron)	$5,6 \cdot 10^{-6} M$ (Abb.23b)

4. Coenzym-Spezifität: Sowohl NAD als auch NADP können als Wasserstoff-übertragende Coenzyme dienen, wobei alle geprüf-

ten Substrate mit NADP einen geringeren Umsatz als mit NAD zeigten. In bezug auf den Einfluß der Temperatur, verschiedener Puffer und pH-Werte als auch der K_m -Werte mit E_2 -17 β und Testosteron als Substrate verhalten sich die solubilisierten mikrosomalen 17 β -HSD-Aktivitäten wie die aus der Cytoplasmakfraktion isolierten.

Die zwei 17 β -HSD-Aktivitäten zeigen nach Solubilisierung, Anreicherung und Trennung voneinander lediglich eine geringe Aktivität beim Wasserstoff-Transfer zwischen C_{17} von E_2 -17 β und C_{17} von Androstendion. Auf der anderen Seite katalysieren intakte Mikrosomen und ein durch Vorinkubation rekombiniertes integratives System der vorher durch verschiedene Maßnahmen aufgetrennten Mikrosomenfraktionen einen hochaktiven Wasserstofftransfer zwischen E_2 -17 β und Androstendion. Der Einfluß der Temperatur und Zeit auf das Rekombinationsverhalten der beiden 17 β -HSD-Aktivitäten wird beschrieben, außerdem wurde das pH-Optimum beim Wasserstoff-Transfer bestimmt.

6. Literatur

1. Rephe, K.: A. e. P. P., 226, 219 (1955)
2. Ryan, K. J.: J. biol. Chem., 234, 2006 (1959)
3. Ryan, K. J.: Endocrinology, 66, 491 (1960)
4. Ryan, K. J. und Engel, L. L.: Endocrinology, 52, 277, (1953)
5. Ryan, K. J. und Engel, L. L.: Endocrinology, 52, 287, (1953)
6. Velle, W. und Eriksen, S.: Acta endocr.(Kbh.)33, 277 (1960)
7. Hagermann, D.D. und Villee, C.A.: J. biol. Chem., 234, 2031 (1959)
8. Jarabak, J., Adams, J.A. und Williams-Ashman, H.G und Talalay, P.: J. biol. Ch. 237, 345 (1962)
9. Breuer, H. und Knuppen, R.: Nature 182, 1512 (1958)
10. Breuer, H. und Knuppen, R. und Nocke, L.: Biochem. J. 71, 26P (1959)
11. Breuer, H., Knuppen, R. und Pangels, G.: Hoppe Seyler 317, 248, (1959)
12. Mittermayer, C., Breuer, H. und Dirscherl, W.: Acta Endocr. (Kbh) 43, 195 (1963)
13. Pearlman, W.H. und De Meio, R.H.: J. biol. Chem. 179, 1141, (1949)
14. Portius, H.J. und Rephe, K.: A. e. P. P. 239, 144 (1960)
15. Portius, H.J. und Rephe, K.: A. e. P. P. 239, 299 (1960)
16. Portius, H.J. und Rephe, K.: Naturwiss. 47, 43 (1960)
17. Markwardt, F. und Rephe, K.: A. e. P.P. 224, 341, (1955)
18. Bischoff, F., Torres, A. und Lopez, G.: Amer. J. Physiol. 189, 447 (1957)
19. Langer, L.J., Alexander, J.A. und Engel, L.L.: J. biol. Ch. 234, 2609 (1959)
20. Langer, L.J. und Engel, L.L.: J. biol. Chem. 233, 583 (1958)

21. Breuer, H.: *Arzneim.-Forschg.* 9, 667 (1959)
22. Pollow, K. und Pollow, B.: *Hoppe Seyler* 353, 53 (1972)
23. Pollow, K.: *Dissertation, Freie Universität Berlin* (1970)
24. Pollow, K. und Pollow, B.: *Z. Naturforsch.* 26b, 710 (1971)
25. Pollow, K. und Pollow, B.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1257 (1971)
26. Pollow, K., Sokolowsky, G., Grunz, H. und Pollow, B.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 501 (1974)
27. Pollow, K., Sokolowsky, G., Schmalbeck, J. und Pollow, B.: *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 515 (1974)
28. Pollow, K. und Pollow, B.: *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 547 (1970)
29. Lehmann, W.D. und Breuer, H.: *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 1633 (1967)
30. Schulze, H.-U. und Staudinger, H.: *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 309
31. Baumann, E., Mukherjee, J.N. und Vogel, L.: *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 229, 15 (1934)
32. Hayase, K. und Tappel, A.L.: *J. Biol. Chem.* 244, 2269 (1969)
33. Falconer, J.S. und Taylor, D.B.: *Biochem. J.* 40, 831 (1946)
34. Phillips, A.H. und Langdon, R.G.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957)
35. Lester, R.L. und Fleischer, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 47, 358 (1961)
36. Vesterberg, O. und Svensson, H.: *Acta Chem. Scand.* 20, 820 (1966)
37. Wrigley, C.: *Sci. Tools* 15, 17 (1968)
38. Rodbard, D. und Chramback, A.: *Anal. Biochem.* 40, 95 (1971)
39. Falck, J., Lees, M. und Sloane-Stanley, G.H.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957)
40. Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.* 234, 466 (1959)

41. Wagner, H.: Fette, Seifen, Anstrichm. 63, 1115 (1961)
42. Stripski, V.P., Peterson, R.F. und Barclay, M.: Biochem. J. 90, 374 (1964)
43. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr. A.L. und Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
44. Karnovsky, M.J.: J. Cell. Biol. 27, 137A (1965)
45. Spurr, H.R.: J. Ultrastruct. Res. 26, 31 (1969)
46. Trump, B.F., Dittera, S.M. Byrne, W.L. und Arstila, A.U.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66, 433 (1970)
47. Martonosi, A.: J. Biol. Chem. 273, 71 (1968)
48. Duttera, S.M., Byrne, W.L. und Ganosa, M.C.: J. Biol. Chem. 243, 2216 (1968)
49. Martonosi, A., Donley, J. und Halpin, R.A.: J. Biol. Chem. 213, 61 (1968)
50. Schulze, H.-U., Gallenkamp, H. und Staudinger, H.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 391 (1973)
51. Talalay, P. und Williams-Ashman, H.G.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44, 15 (1958)
52. Talalay, P., Hurlock, B. und Williams-Ashman: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44, 862 (1958)
53. Jarabak, J. Seeds, E. und Talalay, P.: Biochemistry 5, 1269 (1966)
54. Karavolas, H.J., Baedeker, M.L. und Engel, A.L.: J. Biol. Chem. 245, 4948 (1970)
55. Karavolas, H.J. und Engel, L.L.: Endocrinology 88, 1165 (1971)
56. Lehming, A.L.: Naturwissenschaften 53, 57 (1966)
57. Katagisi, M., Ganguli, R.N. und Gunsalus, J.C.: J. Biol. Chem. 243, 3543 (1968)
58. Wenzel, M., Bollert, B. und Ahlers, B.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 969 (1974)

59. Wenzel, M., Pollow, K. und Ziebarth, T.: Z. Naturforsch. 22b, 894 (1967)
60. Wenzel, M. und Wolf, S.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1203 (1969)
61. Gershman, H. und Abeles, R.H.: Arch Biochem. Biophys. 151, 659 (1973)

Lebenslauf

8. Februar 1946	geboren in 287 Delmenhorst
Frühjahr 1966	Reifeprüfung am Gymnasium a. d. Max-Planck-Str. in Delmenhorst
April 1966 bis Herbst 1967	Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundesmarine
Sommersemester 1968	Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
18. Februar 1974	Staatsexamen
Herbst 1972 bis Juli 1974	Anfertigung der Dissertation im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin in der Arbeitsgruppe Sexualhormonforschung (Dr. Kunhard Pollow)
März bis Juni 1974	Medizinalassistent am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin in der Arbeitsgruppe Pollow
Juli bis Oktober 1974	Medizinalassistent am St. Josef-Stift Delmenhorst auf der chirurgischen Abteilung
November 1974 bis Februar 1975	Medizinalassistent am St. Josef-Stift Delmenhorst auf der internen Abteilung
3. März 1975	Approbation, Beginn der chirurgischen Facharztausbildung am St. Josef-Stift Delmenhorst

